

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO  
TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGENITAS Y  
ADQUIRIDAS (Knock-Down) DE CD3**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Jesús Reiné Gutiérrez

Bajo la dirección de los doctores

José R. Regueiro

María José Recio Hoyas

Edgar Fernández-Malavé

**Madrid, 2012**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA



**ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO  
TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y  
ADQUIRIDAS (*Knock-Down*) DE CD3**

TESIS DOCTORAL

JESÚS REINÉ GUTIÉRREZ

Madrid, 2011



# TESIS DOCTORAL

## **ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y ADQUIRIDAS (*Knock-Down*) DE CD3**

Autor: Jesús Reiné Gutiérrez

Directores: Dr. José R. Regueiro  
Dra. María José Recio Hoyas  
Dr. Edgar Fernández-Malavé

Lugar de realización: Área de Inmunología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

Firma del doctorando

VºBº Directores de la tesis

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
2011



José Ramón Regueiro González-Barros, catedrático, María José Recio Hoyas, profesora contratada doctor y Edgar Fernández-Malavé, profesor titular del departamento de Microbiología I (Área de Inmunología) de la Universidad Complutense de Madrid, certifica que la memoria adjunta, titulada: “ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y ADQUIRIDAS (*Knock-Down*) DE CD3” ha sido realizada por el licenciado Jesús Reiné Gutiérrez bajo la dirección de quién suscribe, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

**José R. Regueiro**

**María José Recio Hoyas**

**Edgar Fernández-Malavé**



“Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a  
alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

Louis Pasteur

En la batalla de la vida, no siempre la gana  
el hombre más fuerte o el más ligero,  
porque tarde o temprano el hombre que gana  
es aquel que cree poder hacerlo.

Rudyard Kipling





A mis padres, especialmente a mi madre  
Por su sacrificio y esfuerzo

A Nathalie,  
Por estar siempre a mi lado



## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y ADQUIRIDAS (*Knock-Down*) DE CD3

<b>I.-ÍNDICE</b>	1
<b>II.-AGRADECIMIENTOS</b>	7
<b>III.-ABREVIATURAS</b>	9
<b>IV.-RESUMEN</b>	11
<b>V.- INTRODUCCIÓN</b>	13
1. El receptor de la célula T o complejo TCR/CD3	13
2. Transducción de señales vía TCR/CD3	26
3. La deficiencias de CD3	37
4. Linfocitos T transformados con <i>Herpesvirus saimiri</i>	45
<b>VI.-OBJETIVOS</b>	48
<b>VII.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	49
1. Material biológico	49
2. Fenotipo	50
3. Función	53
4. Bioquímica	57
5. <i>Knock-Down</i> (KD) de CD3	60
<b>VIII.-RESULTADOS</b>	65
1. Señalización en la deficiencia congénita de CD3 $\gamma$	65
2. Fenotipo y función en la deficiencia adquirida (KD) para CD3 $\gamma$ o CD3 $\delta$	89
<b>IX.- DISCUSIÓN</b>	103
1. La deficiencia congénita o adquirida (KD) de CD3 $\gamma$ no impide la señalización en linfocitos T maduros	103
2. La deficiencia adquirida (KD) de CD3 $\delta$ dificulta la expresión y algunas funciones del complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros	112
<b>X.- CONCLUSIONES</b>	117
<b>XI.-BIBLIOGRAFÍA</b>	119
<b>XII.- PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS</b>	131
<b>XIII.-OTRAS PUBLICACIONES</b>	178
<b>XIV.- CURRICULUM VITAE</b>	195

<b>I.- ÍNDICE</b>	1
<b>II.-AGRADECIMIENTOS</b>	7
<b>III.-ABREVIATURAS</b>	9
<b>IV.-RESUMEN</b>	11
<b>V.- INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>1. El receptor de la célula T o complejo TCR/CD3</b>	13
1.1. El linfocito T y su receptor TCR/CD3	13
1.2. Estructura y estequiometría	16
1.3. Desarrollo de los linfocitos T	22
<b>2. Transducción de señales vía TCR/CD3</b>	26
2.1. Señalización intracelular	26
2.2. Las proteínas-tirosina-quinasa (PTK)	27
2.3. Proteínas adaptadoras (LAT)	30
2.4. Proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina (Vav)	31
2.5. Las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK)	32
2.6. Factores de transcripción (NFAT)	34
2.7. Reorganización del citoesqueleto	35
<b>3. Las deficiencias de CD3</b>	37
3.1. Deficiencias completas	37
3.2. Deficiencias parciales	41
<b>4. Linfocitos transformados con <i>Herpesvirus saimiri</i></b>	45
4.1. Fenotipo	46
4.2. Aplicaciones al estudio de las inmunodeficiencias	47
<b>VI.-OBJETIVOS</b>	48
<b>VII.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	49
<b>1. Material biológico</b>	49
1.1. Humano	49
<b>2. Fenotipo</b>	50
2.1. Tinción extracelular	50
2.2. Tinción intracelular	50
2.3. Anticuerpos utilizados	51
<b>3. Función</b>	53
3.1. Internalización del TCR/CD3	53
3.2. Inducción del flujo de $Ca^{2+}$	53
3.3. Proliferación celular	54
3.4. Inducción de CD69	54
3.5. Fosforilación de proteínas	55
3.6. Reorganización de la F-actina	55
<b>4. Bioquímica</b>	57
4.1. Obtención del lisado celular completo	57
4.2. SDS-PAGE, transferencia, bloqueo y revelado	57
4.3. Inmunoprecipitación	58
4.4. Re-blotting	58
4.5. Densitometría de bandas	59
4.6. Reactivos: Western-blot/Inmunoprecipitación	59
<b>5. <i>Knock-Down(KD)</i> de CD3</b>	60

5.1. Diseño y preparación de siRNA.....	60
5.2. Transfección mediante electroporación .....	60
5.3. Efectos a nivel de proteína .....	62
5.4. Reactivos: siRNA.....	63
<b>VIII.-RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>1. Señalización en la deficiencia congénita de CD3<math>\gamma</math>.....</b>	<b>65</b>
1.1. Linfocitos T transformados, en respuesta a anti-CD3.....	65
1.1.1. Defectos en la fosforilación de TCR $\zeta$ y en la defosforilación de NFAT .....	65
1.1.2. Fosforilación de las proteínas ZAP-70, LAT y las MAPK ERK y p38 normal.....	68
1.1.3. Fosforilación de las proteínas Vav y JNK constitutiva .....	73
1.1.4. Fosforilación de mTORC2 normal.....	75
1.1.5. Reorganización de la actina filamentosa normal.....	76
1.1.6. Proliferación en ausencia de CD3 $\gamma$ normal .....	79
1.2. Linfocitos T transformados, en respuesta a pervanadato .....	81
1.3. Linfocitos primarios .....	85
1.3.1. Función de las iNKT en respuesta a $\alpha$ -Galactosil-ceramida normal .....	85
<b>2. Fenotipo y función en la deficiencia adquirida (KD) para CD3<math>\gamma</math> o CD3<math>\delta</math>.....</b>	<b>89</b>
2.1. <i>Knock-Down</i> específico .....	89
2.2. Papel diferencial de las cadenas CD3 $\gamma$ y CD3 $\delta$ en la expresión del complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 en superficie .....	93
2.3. Análisis funcional:	
2.3.1. Defecto selectivo de internalización del complejo TCR/CD3 inducido por PMA en las células silenciadas para CD3 $\gamma$ .....	97
2.3.2. Defecto en la inducción del flujo de Ca <sup>2+</sup> en las células silenciadas para CD3 $\delta$ .....	98
2.3.3. Inducción de CD69 normal en las células silenciadas .....	99
<b>IX.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
1. La deficiencia congénita o adquirida (KD) de CD3 $\gamma$ no impide la señalización en linfocitos T maduros.....	103
2. La deficiencia adquirida (KD) de CD3 $\delta$ dificulta la expresión y algunas funciones del complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros.....	112
<b>X.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>117</b>
<b>XI.-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>119</b>
<b>XII.- PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS .....</b>	<b>131</b>
1. El complejo TCR/CD3: Especificidad con flexibilidad. Pérez-Flores V, Guardo AC, Rossi NE, Recio MJ, Reiné J, Regueiro JR. <b>Inmunología. 2006 Enero-Marzo;1(25):50-56</b> .....	131
2. CD3D. Recio MJ, Reiné J, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. <b>Targeted Proteins Database 1, [21703], Current Biodata 10.2970/tpdb.2008.172</b> .....	138
3. CD3 $\gamma$ -independent pathways in TCR mediated-signaling in mature T and iNKT lymphocytes. Reiné J, Busto EM, Muñoz-Ruiz M, Rossi NE, Rodríguez-Fernández JL, Martínez-Naves E, JR Regueiro, Recio MJ. <b>Cell Immunol. 271 (2011) 62-66</b> .....	156
4. A leaky mutation in CD3D leads to a T $\alpha\beta$ <sup>-</sup> T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> human SCID. Gil J, Busto EM, Chean C, Garcillán B, Cruz García-Rodríguez M, Díaz-Alderete A, Navarro J, Reiné J, Mencía A, Gurbindo D, Beléndez C, Gordillo I, Duchniewicz M, Höhne K, López-Granados E, Schammel WW, Moreno-Pelayo MA, Recio MJ, Regueiro JR. <b>Journal of Clinical Investigation 2011</b> .....	168

5. Human $\alpha\beta$ TCR surface expression and function/signaling is differentially affected by knock-down of CD3 $\gamma$ and CD3 $\delta$ . Reiné J, Recio MJ, Garcillán B, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. <b>Submitted 2011</b> .....	173
6. Inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo TCR/CD3. Reiné J, Recio MJ, Regueiro JR. <b>Submitted 2011</b> .....	176
<b>XIII.-OTRAS PUBLICACIONES</b> .....	178
1. Differential antibody binding to the surface $\alpha\beta$ TCR·CD3 complex of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. Rossi NE, Reiné J, Pineda-Lezami M, Pulgar M, Meza NW, Swamy M, Risueño R, Schamel WW, Bonay P, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. <b>Int Immunol. 2008 Oct;20(10):1247-58</b> .....	178
2. <i>CD3G</i> transmembrane mutation p.V131F as a putative immunodeficiency risk factor. Recio MJ, Busto EM, Reiné J, Pérez-Flores V, Crespo AC, Allende LM, van Montfrans JM, Lefranc G, Moreno-Pelayo MA, Regueiro JR. <b>Submitted 2011</b> .....	190
3. c.657CT polymorphism in exon 3 of <i>CIAS1</i> gene is not associated with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). Reiné J, Couso J, Gurbindo D, Regueiro JR, Recio MJ. <b>Submitted 2011</b> .....	192
<b>XIV.- CURRICULUM VITAE</b> .....	195

## Índice de tablas y figuras

<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores y sus ligandos .....	14
<b>Figura 2.</b>	Representación esquemática del receptor para el antígeno de una célula T $\alpha\beta$ ( $\alpha\beta$ TCR/CD3).....	17
<b>Figura 3.</b>	Modelo propuesto de ensamblaje del complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3.....	21
<b>Figura 4.</b>	La expresión del complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 en células no -T humanas (293T) es posible cuando falta CD3 $\gamma$ o CD3 $\delta$ , pero no cuando falta otra cadena.....	21
<b>Figura 5.</b>	Representación esquemática de las posibles estequiometrias del complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 (o pre- $\alpha\beta$ TCR/CD3) en condiciones normales o en ausencia de alguna de las cadenas CD3 y sus efectos diferenciales observados en el desarrollo linfóide T en humano y ratón .....	22
<b>Figura 6.</b>	Representación esquemática del desarrollo y diferenciación de las células T en el timo .....	24
<b>Figura 7.</b>	Modelo propuesto de afinidad en la selección positiva y negativa.....	25
<b>Figura 8.</b>	Representación esquemática de las rutas de transmisión de señales intracelular tras la activación del complejo TCR/CD3.....	28
<b>Figura 9.</b>	Fosforilación intracelular del complejo TCR/CD3 mediado por proteínas-tirosina-quinazas (PTK) .....	29
<b>Figura 10.</b>	Potenciales sitios de fosforilación de tirosinas en la proteína adaptadora LAT .....	30
<b>Figura 11.</b>	Representación esquemática de los diferentes dominios y su función en la proteína Vav.....	31
<b>Figura 12.</b>	Representación esquemática de las cascadas de señalización de las MAPK.....	33
<b>Figura 13.</b>	Modelo propuesto sobre la regulación y activación de NFAT .....	35
<b>Figura 14.</b>	Bloqueo parcial (.....) o completo (—) de la diferenciación temprana de las células T causada por la ausencia de las cadenas invariantes del complejo TCR en humanos y ratón. ....	37
<b>Figura 15.</b>	Expresión comparativa de CD3 (clon entre paréntesis) entre linfocitos T deficientes (línea discontinua) y control (línea continua) transformados con HVS.....	47
<b>Figura 16.</b>	Monitorización de la incorporación de un siRNA trazador (siGLORed) mediante citometría de flujo.....	61
<b>Figura 17.</b>	Fosforilación de la cadena TCR $\zeta$ en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .....	67
<b>Figura 18.</b>	Desfosforilación del Factor Nuclear de células T Activadas (NFAT) en células T deficientes en CD3 $\gamma$ transformadas con HVS.....	67
<b>Figura 19.</b>	La fosforilación de la proteína ZAP-70 es sostenida en el tiempo en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .....	69
<b>Figura 20.</b>	La cantidad de proteína fosforilada de ZAP-70 es menor en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .....	70
<b>Figura 21.</b>	La fosforilación de la proteína adaptadora LAT es normal en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .....	71
<b>Figura 22.</b>	Activación en respuesta a TCR de las MAP kinasas ERK, JNK y p38 en células T deficientes en CD3 $\gamma$ transformadas con HVS.....	72
<b>Figura 23.</b>	Respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3 en células T deficientes en CD3 $\gamma$ transformadas con HVS.....	72
<b>Figura 24.</b>	Análisis de la fosforilación de ERK mediante citometría de flujo intracelular de células T deficientes en CD3 $\gamma$ .....	73
<b>Figura 25.</b>	Fosforilación de la tirosina de Vav inducida mediante TCR.....	75
<b>Figura 26.</b>	Fosforilación de la proteína mTORC-2 en células T deficientes en CD3 $\gamma$ normal.....	76
<b>Figura 27.</b>	Reorganización de los filamentos de actina normal en respuesta a CD3 en células T deficientes para CD3 $\gamma$ transformadas con HVS.....	78



<b>Figura 28.</b> Proliferación celular de las células deficientes en CD3 $\gamma$ normal en respuesta a anticuerpos anti-CD3 .....	80
<b>Figura 29.</b> Fosforilación de tirosinas en respuesta a pervanadato (PV) durante 5 minutos en células T control ( $\gamma^{+/+}$ ) heterocitogo ( $\gamma^{+/-}$ ) y deficiente ( $\gamma^{-/-}$ ) transformadas con HVS. Cuantificación mediante densitometría de bandas de la fosforilación de tirosinas en respuesta a pervanadato en células T control ( $\gamma^{+/+}$ ) heterocitogo ( $\gamma^{+/-}$ ) y deficiente ( $\gamma^{-/-}$ ) transformadas con HVS.....	82
<b>Figura 30.</b> Figura resumen de las principales rutas de señalización intracelular analizadas en ausencia de la cadena CD3 $\delta$ en linfocitos T transformados con HVS.....	84
<b>Figura 31.</b> Las células iNKT $\gamma^{-/-}$ muestran una respuesta normal a la $\alpha$ -galactosil-ceramida y niveles más elevados de expresión para V $\beta$ 11 .....	87
<b>Figura 32.</b> Patrones de reactividad de la expresión de TCRV $\beta$ 11 tras la estimulación con $\alpha$ -GalCer a día 1 .....	88
<b>Figura 33.</b> Silenciamiento de la expresión del KD de CD3 $\gamma$ en linfocitos T Jurkat.....	92
<b>Figura 34.</b> Silenciamiento de la expresión de CD3 $\delta$ con siRNA específicos en linfocitos T Jurkat.....	92
<b>Figura 35.</b> Diagramas normalizados de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para una amplia batería de anticuerpos tras el <i>knock-down</i> de las cadenas CD3 $\gamma$ y CD3 $\delta$ transcurridas 48 horas. ....	95
<b>Figura 36.</b> Silenciamiento de la expresión de las cadenas CD3 $\delta$ y CD3 $\gamma$ al cabo de 24-48 horas post-electroporación.....	96
<b>Figura 37.</b> Análisis funcional del complejo TCR/CD3 en las células silenciadas para CD3 $\delta$ y CD3 $\gamma$ .....	100
<b>Figura 38.</b> Representación esquemática de las rutas de transmisión de señales intracelular tras la activación del complejo TCR/CD3 en ausencia de CD3 $\gamma$ .....	111
<b>Figura 39.</b> Modelo propuesto sobre la contribución de las cadenas CD3 $\gamma$ y CD3 $\delta$ en el ensamblaje y expresión del complejo TCR/CD3 tras el <i>Knock-down</i> .....	115
<b>Tabla I.</b> Características de las cadenas (TCR y CD3) que componen el complejo TCR/CD3.....	18
<b>Tabla II.</b> Resumen de los datos clínicos y diagnósticos de los pacientes de CD3 $\gamma^{-/-}$ .....	38
<b>Tabla III.</b> Deficiencias del complejo TCR. Datos clínicos e inmunológicos.....	43
<b>Tabla IV-V.</b> Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados durante el desarrollo de esta tesis .....	51
<b>Tabla VI.</b> Listado de anticuerpos empleados en el análisis bioquímico de la señalización intracelular del complejo TCR/CD3 y en los estudios de <i>Knock down</i> desarrollados en esta tesis .....	52

Durante este período formativo, de varios años, he adquirido un bagaje profesional a nivel académico y personal sin igual. Ha sido muy duro, nada fácil, pero hubiese sido prácticamente imposible sin el apoyo incondicional de algunas personas que me han brindado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Por tanto, quisiera agradecer a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han impulsado a seguir adelante.

En primer lugar, quisiera agradecer al Dr. José Ramón Regueiro (“JR”) por ofrecerme la posibilidad de adentrarme en su laboratorio y estudiar la fisiopatología del complejo TCR/CD3. Agradezco sinceramente tu confianza, consejos, y todo tu apoyo cuando verdaderamente lo he necesitado.

A la Dra. María José Recio (“Merijou”), piedra angular de mi formación, por tu dedicación, apoyo y profesionalidad. No tengo suficientes palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. De ti me llevo tu idealismo, entusiasmo, el trabajo en equipo y la exigencia en los resultados.

A todos los jefes de grupo (Eduardo Martínez-Naves, Manolo Gómez, José M. Martín-Villa, Pedro Reche y Esther LaFuente) por vuestra amistad, consejos y apoyo en todo momento, pero especialmente a Edgar Fernández-Malavé por ayudarme en los momentos más difíciles, más allá de la ciencia.

A Juani y José Manuel Quijano por su compañía, amistad y afecto cada vez que llegaba por las mañanas al departamento.

A todos los compañeros (vieja y nueva guardia) y alumnos de colaboración que ya no se encuentran en el departamento, quisiera agradecer todos los buenos momentos pasados dentro y fuera del laboratorio.

Me gustaría agradecer y destacar el apoyo incondicional y sin reservas de mi padres y hermanos Rafael y Rocío, pero especialmente a mi madre a la que recuerdo cada día, y aunque ya no estés entre nosotros, todo lo que soy te lo debo a ti. Además, quiero agradecer el apoyo de la familia de Nathalie (Yannick, Claudine y Pierre) por estar siempre ahí, y por supuesto a ella por su paciencia, apoyo, cariño y comprensión.

Por último, quisiera agradecer a todos aquellos profesores y grandes amigos que han contribuido a mi formación, desde pequeño hasta la actualidad, puesto que la perseverancia, la responsabilidad y el buen saber hacer son virtudes que han logrado transmitirme con éxito. Por último, agradecer a la Comunidad Autónoma de Madrid y a la Universidad Complutense de Madrid, por facilitarme siempre las cosas y hacerme sentir un madrileño más. A todos ellos... MUCHAS GRACIAS.



<b><math>\alpha</math>-GalCer:</b> $\alpha$ -Galactosil-Ceramida	<b>KD:</b> <i>Knock-down</i> directamente del inglés
<b><math>\alpha</math>-p-Tyr:</b> Anticuerpo anti-fosfo-tirosina	<b>LAT:</b> <i>Linker</i> para la activación de la célula T
<b>ADP:</b> Adenosín difosfato	<b>mAb:</b> Anticuerpo monoclonal
<b>APC:</b> Célula presentadora de antígeno	<b>MAPK:</b> Proteínas quinasas activadoras de mitógenos
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>MFI:</b> Intensidad media de fluorescencia
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>MHC:</b> Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>BSA:</b> Albúmina de suero bovino	<b>NFAT:</b> Factor nuclear de activación de células T
<b>CD:</b> Grupo de diferenciación	<b>NK:</b> Natural Killer
<b>cDNA:</b> Ácido desoxirribonucleico copia	<b>O/N:</b> “ <i>Overnight</i> ” Incubación durante toda la noche.
<b>CFE:</b> Citometría de flujo extracelular	<b>ORF:</b> Marco abierto de lectura
<b>CFI:</b> Citometría de flujo Intracelular	<b>PAGE:</b> Gel de electroforesis de poliacrilamida
<b>CFSE:</b> Diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil	<b>Pb:</b> Pares de bases
<b>DEPC:</b> Dietil pirocarbonato	<b>PBL:</b> Linfocito de sangre periférica
<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>PBMC:</b> Células mononucleares de sangre periférica
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético	<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino
<b>ERK:</b> Quinasa regulada por señales extracelulares	<b>PE:</b> Ficoeritrina
<b>F-actina:</b> Actina filamentosa	<b>PE:</b> Fosfatidil-etanolamina
<b>FCS:</b> Suero fetal bovino	<b>PF:</b> Paraformaldehído
<b>FITC:</b> Isotiocianato de fluoresceína	<b>PHA:</b> Fitohemaglutinina
<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa	<b>PIM:</b> Fosfatidilinositol-manosa (PIM)
<b>GEF:</b> Factor de intercambio de nucleótidos de guanina	<b>PMA:</b> Acetato 12- forbol, 13- miristato
<b>GPI:</b> glucosil-fosfatidilinositol	<b>PMSF:</b> Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
<b>GTP:</b> Guanosín trifosfato	<b>PTK:</b> Proteína-tirosina-quinasa
<b>HVS:</b> <i>Herpesvirus saimiri</i>	<b>PV:</b> Pervanadato
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b> Interferón gamma	<b>PVDF:</b> Polifloruro de vinilideno
<b>Igs:</b> Inmunoglobulinas	<b>r.p.m.:</b> Revoluciones por minuto
<b>iGB3:</b> Isoglobotrihexosylceramida	<b>RNA:</b> Ácido ribonucleico
<b>iNKT:</b> Células NKT invariantes	<b>RNA<sub>m</sub>:</b> Ácido ribonucleico mensajero
<b>IL:</b> Interleuquina	<b>RPMI:</b> Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute)
<b>IP:</b> Inmunoprecipitación	<b>SCID:</b> Inmunodeficiencia Combinada Severa
<b>ITAM:</b> Motivo de activación basado en tirosinas	<b>SD:</b> Desviación estándar
<b>JGN:</b> Jurkat Gamma Negative	<b>SDS:</b> Dodecil sulfato sódico
<b>JNK:</b> Quinasa reguladora de c-Jun	<b>SH2:</b> Dominio de homología Src tipo 2
<b>kD:</b> Kilodalton	

**SH3:** Dominio de homología Src tipo 3

**siRNA:** RNA interferente

**SMAC:** Grupo de activación supramolecular

**TE:** Tinción extracelular

**TI:** Tinción intracelular

**TBS:** Tampón Tris salino

**TBST:** Tampón Tris salino con Tween

**TCR:** Receptor para el antígeno de células T

**TRITC:** Tetra-metil-rodamina isotiocianato

**WB:** Western-blot

**WT :** Wild type

**ZAP70:** Proteína asociada a CD3 $\zeta$  de 70kD

## ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3 EN LAS DEFICIENCIAS CONGÉNITAS Y ADQUIRIDAS (*Knock-Down*) DE CD3

**Autor:** Jesús Reiné Gutiérrez

**Directores:** Dr. José R. Regueiro y Dra. María José Recio Hoyas

El receptor del linfocito T es un complejo multimérico integrado por diferentes cadenas, entre las cuales las cadenas variables TCR (TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ ) son las encargadas del reconocimiento antigénico, mientras que las cadenas invariantes CD3 ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) y TCR $\zeta$  son responsables del ensamblaje y la expresión del complejo TCR/CD3, así como de la señalización intracelular. La falta de alguna de las cadenas CD3 causa en humanos un grupo de inmunodeficiencias del linaje T que, en el caso de CD3 $\gamma$ , permite una cierta producción de linfocitos Th y Tc maduros que expresan el complejo TCR/CD3 con una estequiometría aberrante y una mala asociación a TCR $\zeta$ , lo que podría explicar en parte el defecto parcial de expresión del complejo TCR/CD3 en superficie. Este hecho permite abordar el estudio del papel biológico de la cadena CD3 $\gamma$  en la construcción de complejos TCR/CD3, y posteriormente en la señalización en linfocitos T maduros. Nuestros resultados en linfocitos T primarios y transformados carentes de CD3 $\gamma$  demuestran que dicha cadena no es imprescindible en la mayoría de las rutas de señalización analizadas como la fosforilación de algunos sustratos (ZAP70, LAT, mTORC2, ERK1/2 y p38), la reorganización de la actina filamentosa y la expansión de las células iNKT. Sin embargo, se observaron defectos en la fosforilación de otros sustratos como TCR $\zeta$ , o en la defosforilación de NFAT.

Por otra parte, nos propusimos abordar el papel estructural o funcional de la cadena CD3 $\delta$  en el desarrollo de los linfocitos T. A pesar del elevado grado de homología que comparte con CD3 $\gamma$ , sólo CD3 $\delta$  muestra una función no redundante en el comienzo del desarrollo T, como lo demuestra el hallazgo de que en ausencia de CD3 $\delta$ , pero no CD3 $\gamma$ , se carece completamente de linfocitos T en sangre periférica. Con objeto de abordar el papel de CD3 $\delta$ , nos hemos propuesto analizar el efecto de su deficiencia adquirida mediante interferencia (*Knock-Down*), en comparación con los mutantes naturales de CD3 $\gamma$ . Nuestros resultados de *Knock-Down* en linfocitos T demostraron que CD3 $\delta$  es esencial para la expresión normal del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3, mientras que el *Knock-Down* de CD3 $\gamma$  afectó únicamente a la expresión y a la internalización del complejo TCR/CD3 mediada por esteres de forbol. Por el contrario, la señalización/función mediada por el flujo de calcio y la

inducción de CD69 fue esencialmente CD3 $\gamma$ - o CD3 $\delta$  independiente, respectivamente. Podemos concluir que, a pesar del alto grado de homología entre ambas cadenas, sólo CD3 $\delta$  contribuye de forma no redundante a la expresión en superficie del complejo TCR/CD3, lo cual podría explicar su papel diferencial durante el desarrollo de las células T.

Este trabajo ha sido financiado con fondos del Ministerio de Educación (BFU2005-01738/BMC; BMC2002-03247), de la Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0570/2004), del Fondo de Investigación Sanitaria (PI080921), de la Dirección General de Universidades e Investigación y de la Fundación Mutua Madrileña. El autor fue becado por la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM-BOCM 15/10/2004 N° EXP 0737).

### Publicaciones relacionadas con la tesis:

- El complejo TCR/CD3: Especificidad con flexibilidad. Pérez-Flores V, Guardo AC, Rossi NE, Recio MJ, **Reiné J**, Regueiro JR. **Immunología. 2006 Enero-Marzo**..... **131**
- CD3D. Recio MJ, **Reiné J**, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **Targeted Proteins Database 1, [21703], Current Biodata 10.2970/tpdb.2008.172**..... **138**
- CD3 $\gamma$ -independent pathways in TCR mediated-signaling in mature T and iNKT lymphocytes. **Reiné J**, Busto EM, Muñoz-Ruiz M, Rossi NE, Rodríguez-Fernández JL, Martínez-Naves E, JR Regueiro, Recio MJ. **Cellular Immunology 271 (2011) 62-66**..... **156**
- A leaky mutation in CD3D leads to a T $\alpha\beta$ <sup>-</sup>T $\gamma\delta$ <sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> human SCID. Gil J, Busto EM, Chean C, Garcillán B, Cruz García-Rodríguez M, Díaz-Alderete A, Navarro J, **Reiné J**, Mencía A, Gurbindo D, Beléndez C, Gordillo I, Duchniewicz M, Höhne K, López-Granados E, Schammel WW, Moreno-Pelayo MA, Recio MJ, Regueiro JR. **Journal of Clinical Investigation 2011** ..... **168**
- Human  $\alpha\beta$ TCR surface expression and function/signaling is differentially affected by knock-down of CD3 $\gamma$  and CD3 $\delta$ . **Reiné J**, Recio MJ, Garcillán B, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **Submitted 2011**..... **173**
- Inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo TCR/CD3. **Reiné J**, Recio MJ, Regueiro JR. **Submitted 2011**.... **176**

### Otras publicaciones:

- Differential antibody binding to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. Rossi NE, **Reiné J**, Pineda-Lezamis M, Pulgar M, Meza NW, Swamy M, Risueño R, Schamel WW, Bonay P, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **Int Immunol. 2008 Oct;20(10):1247-58**..... **178**
- CD3G transmembrane mutation p.V131F as a putative immunodeficiency risk factor. Recio MJ, Busto EM, **Reiné J**, Pérez-Flores V, Crespo AC, Allende LM, van Montfrans JM, Lefranc G, Moreno-Pelayo MA, Regueiro JR. **Submitted 2011**..... **190**
- c.657CT polymorphism in exon 3 of CIAS1 gene is not associated with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). **Reiné J**, Couso J, Gurbindo D, Regueiro JR, Recio MJ. **Submitted 2011** ..... **192**

## El receptor de la célula T o complejo TCR/CD3.

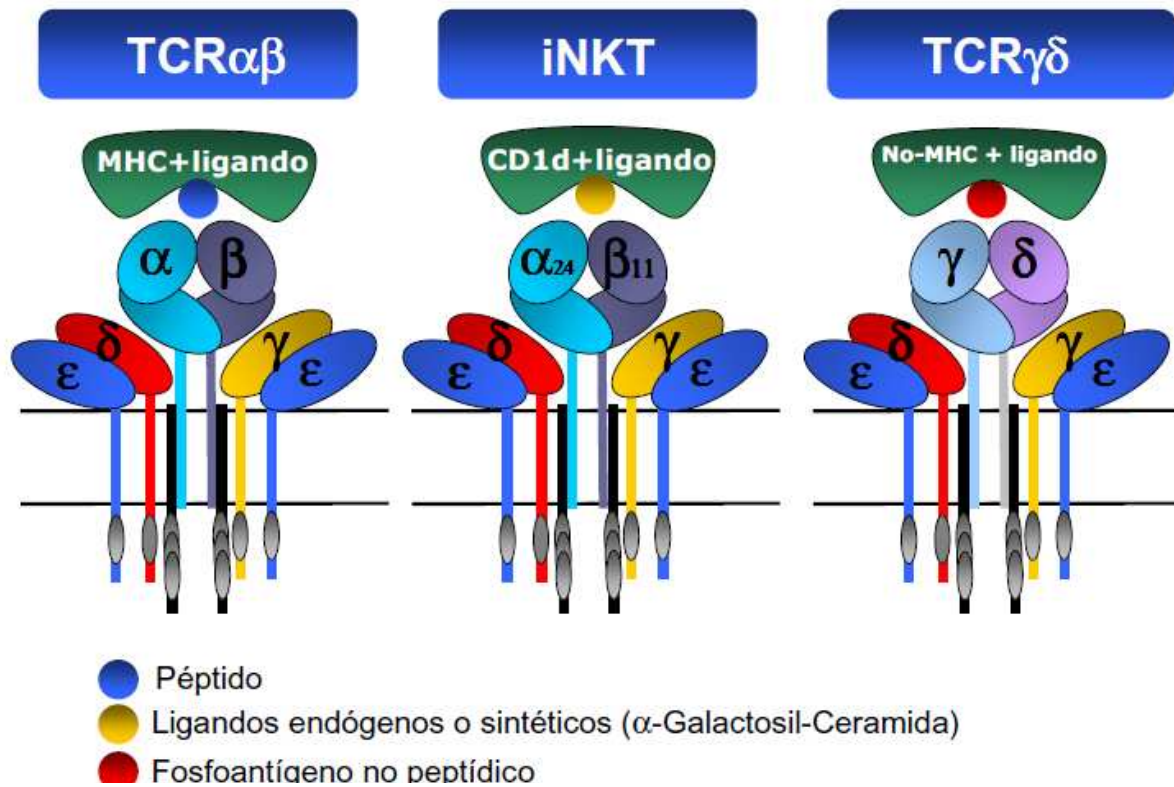
### 1.1. El linfocito T y su receptor TCR/CD3.

El linfocito T es la célula más importante de la respuesta inmune adaptativa y se caracteriza por presentar en su superficie un receptor clonotípico (TCR/CD3) capaz de reconocer antígenos mayoritariamente presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Fremont DH et al, 1996; Garcia KC et al, 2005; Godfrey DI et al, 2008).

Existen dos subpoblaciones principales de linfocitos T, la subpoblación  $T\alpha\beta$  (mayoritaria en humanos, 90-95% de las células periféricas) (Brenner MB et al, 1987) y la subpoblación  $T\gamma\delta$  (minoritaria en humanos, 10-5% de las células periféricas) (Li H et al, 1998). Entre los primeros, se distinguen, a su vez, las células pertenecientes al linaje  $CD4^+$  (Th, cooperadoras) y las pertenecientes al linaje  $CD8^+$  (Tc, citotóxicas). Los linfocitos Th actúan como coordinadores de la respuesta inmune – controlan la acción de otros linfocitos y de macrófagos- y los Tc son los responsables de la destrucción de células infectadas y tumorales. Los linfocitos Th reconocen el antígeno cuando éste es presentado por la molécula de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), mientras que los linfocitos Tc lo hacen cuando el antígeno es presentado por las moléculas MHC de clase I (MHC-I) (von Boehmer H et al, 1989).

Las células T de un individuo – repertorio útil- son el resultado de un proceso indiscriminado de generación de diversidad –repertorio posible- seguido de un proceso de selección en el que se elimina la mayoría de las células producidas. Este mecanismo de selección global (selección positiva y negativa) garantiza la afinidad y especificidad adecuadas de los linfocitos que finalmente constituirán nuestra principal barrera de células de defensa adaptativa (Steele EJ et al, 1993; Nossal GJ et al, 1994). Este proceso de selección no es más que una comprobación de cómo es y cómo funciona el receptor del antígeno (complejo TCR/CD3) expuesto en la membrana de las células que se convertirán en linfocitos T. Por ello el conocimiento de la estructura y función del receptor de los linfocitos T (TCR) es determinante para el buen entendimiento de la fisiología de la respuesta inmune adaptativa.





**Figura 1. Representación esquemática de los diferentes tipos de receptores y sus ligandos.** De izquierda a derecha se representan el receptor TCR $\alpha\beta$  de los linfocitos T $\alpha\beta$ , el receptor TCR invariante (V $\alpha$ 24,V $\beta$ 11) de las iNKT y por último el receptor TCR $\gamma\delta$  de los linfocitos T $\gamma\delta$ .

Además, se ha descrito otra subpoblación minoritaria de células T conocida como células iNKT que coexpresan receptores de células NK (NK1.1 y CD122) y que presentan un TCR semi-invariante (**Bendelac A et al, 2007**). Esta subpoblación de células T fue inicialmente descrita en células dobles negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) de ratón, con un TCRV $\beta$ 8.2 y marcadores de células NK (**Budd RC et al, 1987**). Posteriormente, se caracterizó su TCR comprobando que era invariante TCRV $\alpha$ 14, TCRV $\beta$ 8.2 (**Lantz O et al, 1994**).

En humanos se han descrito células iNKT homólogas a las observadas en ratón que expresan marcadores clásicos de células NK (CD161) y que presentan un TCR invariante V $\alpha$ 24-V $\beta$ 11. El fenotipo de estas células iNKT puede ser CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> o bien dobles negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Se ha observado que las células iNKT CD8<sup>+</sup> son incapaces de producir IL-4, a diferencia de las CD4<sup>+</sup> o las dobles negativas. Las células iNKT pueden encontrarse en sangre periférica en un porcentaje reducido (0.2% de células T en sangre), y en hígado su población no es tan abundante como sucede en ratón (**Karadimitris A et al, 2001; Kita H et al, 2002**).

Las células iNKT reconocen antígenos presentados por la molécula CD1d (**Brossay L et al, 1998; Bendelac A et al, 2007; Borg NA et al, 2007**). Se han realizado numerosos estudios para identificar los ligandos naturales o endógenos presentados por CD1d y su efecto sobre las células iNKT. Uno de los ligandos descritos inicialmente en ratones fue el glucosil-fosfatidilinositol (GPI), su unión se establece a través del fosfatidilinositol, que a su vez se une con gran afinidad a CD1d. Este antígeno es reconocido mayoritariamente por las células iNKT murinas (**Molano A et al, 2000**), y podría tener un papel relevante en el mantenimiento de la conformación de CD1d durante su ensamblaje en el retículo endoplasmático, hasta que sea intercambiado por otro antígeno (**De Silva AD et al, 2002**). Otro antígeno natural presentado por CD1d es la fosfatidil-etanolamina (PE) capaz de activar un hibridoma de células iNKT de cadena invariante. La activación depende del grado de insaturación de las cadenas acilo que presenta la PE (**Rauch J et al, 2003**). Por otro lado, se ha descrito otro ligando endógeno presentado por CD1d y reconocido por las células iNKT, la isoglobotrihexosylceramida (iGB3). Este glicolípido se genera a partir de la síntesis o degradación de isoglobotrihexosylceramidas, la degradación es dependiente de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa, y se produce en los lisosomas donde se uniría a CD1d (**Zhou D et al, 2004**). La síntesis es dependiente de galactosil-transferasas (**Keusch JJ et al, 2000**).

Por último, se ha observado que las células iNKT humanas y de ratón pueden reconocer glicolípidos bacterianos presentados por CD1d. El fosfatidilinositol-manosa (PIM) fue descrito como el primer antígeno microbiano capaz de estimular selectivamente las células iNKT (**Fischer K et al, 2004**).

En cuanto a los antígenos sintéticos, el más conocido presentado por CD1d es la  $\alpha$ -Galactosil-Ceramida ( $\alpha$ -GalCer). La  $\alpha$ -GalCer es un glicolípido encontrado en un extracto de la esponja marina *Agelas mauritanus*, donde fue aislado y caracterizado por su actividad antitumoral (**Kawano T et al, 1997**). Básicamente, la  $\alpha$ -GalCer es un hidrato de carbono unido a una ceramida, donde la molécula CD1d se une al fragmento de ceramida, quedando el azúcar hidrofílico expuesto para su unión con el TCR (**Figura 1**).

## 1.2. Estructura y estequiometría.

El receptor clonotípico (TCR/CD3) de las células T es un complejo constituido por un heterodímero TCR $\alpha\beta$  implicado en el reconocimiento antigénico, y unas cadenas invariantes CD3 (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) y CD3 $\zeta$  (CD247) relacionadas con el ensamblaje del receptor (**Call ME et al, 2004**), su expresión en membrana y la transducción de señales (**Alarcón B et al, 2003**).

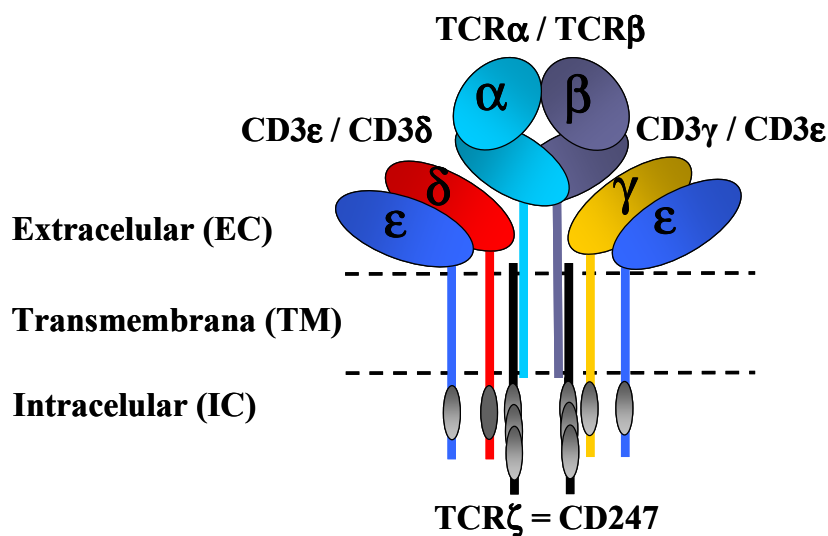
La mayoría de los linfocitos expresan el heterodímero TCR $\alpha\beta$ , constituido por las cadenas polipépticas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , que reconocen péptidos antigénicos unidos al complejo de histocompatibilidad (MHC) de una célula presentadora de antígeno (APC). Un grupo minoritario de linfocitos expresan el heterodímero TCR $\gamma\delta$ , constituido por las cadenas polipeptídicas TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ . Estas células son muy heteróneas desde el punto de vista del reconocimiento antigénico, uniéndose directamente a glicoproteínas y fosfoantígenos derivados de patógenos sin procesar o bien a moléculas MHC-no clásicas (**Hayday AC et al 2000; Das H et al, 2001; Adams EJ et al, 2005**).

Las cadenas polipeptídicas del TCR/CD3 permanecen unidas covalentemente mediante enlaces de disulfuro intracatenarios y presentan una gran homología estructural con la familia de las inmunoglobulinas (**García KC et al, 2010; Adams EJ et al, 2005**). Las cadenas del TCR se organizan en varios dominios estructurales: un dominio extracelular (EC) variable, responsable de la especificidad del TCR, codificado por los segmentos génicos V, D y J que son reordenados clonotípicamente, seguido de un dominio extracelular constante codificado por un segmento génico constante C, un segmento conector, un dominio transmembranal (TM) y un dominio intracitoplasmático (IC) carente de actividad enzimática.

La posibilidad de reconocer una casi infinita variedad de antígenos es debida a los reordenamientos clonales que sufren los genes V, D y J durante la ontogenia, que permiten la generación de  $10^{27}$ - $10^{30}$  tipos de receptores distintos en un individuo concreto (**Weiss A et al, 1994**). La región constante (C) contiene los dominios de unión a membrana (ricos en aminoácidos hidrofóbicos) y los dominios intracelulares (compuestos de 5 a 12 aminoácidos) que, por si mismos, son incapaces de acoplar la señal generada tras el reconocimiento antigénico con la maquinaria intracelular encargada de la transducción de señales. Debido a que las cadenas variables del TCR carecen de una actividad enzimática inherente, se asume

que otras estructuras proteicas asociadas de forma no covalente al heterodímero TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$  transmiten la señal al interior de la célula tras el reconocimiento antigénico. Estas estructuras proteicas son conocidas como las cadenas CD3 (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) y CD3 $\zeta$  (CD247).

La expresión en superficie del heterodímero TCR $\alpha\beta$  depende de la expresión de los heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$ , CD3 $\gamma\epsilon$  y del homodímero CD3 $\zeta\zeta$ , siendo además las cadenas CD3 las subunidades señalizadoras del complejo TCR (Brenner MB et al, 1987; Samelson LE, 2002; Sussman JJ et al, 1988) (Figura 2).



**Figura 2. Representación esquemática del receptor para el antígeno de una célula  $T\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR/CD3). Adaptado de Recio MJ et al, 2007.**

Las cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs) y se encuentran codificadas por genes próximos entre sí y localizados en el cromosoma 11 (**Tunnacliffe A et al, 1987**). Las cadenas CD3 $\zeta$  (CD247), completamente distintas del resto de las cadenas CD3, se asocian a modo de homodímeros  $\zeta\zeta$ , y se encuentran codificadas por el cromosoma 1. Además las cadenas CD3 $\zeta$  pueden asociarse a proteínas diferentes del TCR, y formar parte, por ejemplo, del receptor para la porción Fc de la IgG en células NK (FcRIII-CD16), para el que también transmiten señales. Algunas características estructurales de las cadenas CD3 se resumen en la **Tabla I** (**Clevers H et al, 1988**) y en la **Figura 2**.

Cada una de las cadenas CD3 (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) se encuentra constituida por un dominio extracelular (EC) (de 89,79 y 104 aminoácidos respectivamente) que contiene un

dominio Ig, seguido de un péptido conector. Las cadenas CD3 $\zeta$  (CD247) tan sólo poseen 9 aminoácidos en el dominio extracelular (Sun ZY et al, 2001; Arnett KL et al, 2004; Kjer-Nielsen L et al, 2004; Sun ZY et al, 2004) entre los cuales se encuentran dos cisteínas (Cys) en el motivo [...RxCxxCxEx...] importantes para la dimerización no covalente de dicha cadena (Borrito A et al, 1998).

El dominio transmembranal (TM) de las cadenas CD3 se encuentra altamente conservado en la evolución, y está constituido por aminoácidos cargados negativamente que interaccionan con las cargas positivas de las cadenas TCR. Estas uniones electroestáticas entre las cadenas TCR y CD3 son necesarias para el ensamblaje del complejo TCR/CD3 (Cosson P et al, 1991; Manolios N et al, 1991; Call ME et al, 2004) (Figura 3). El dominio intracitoplasmático (IC) de las cadenas CD3, a diferencia de las cadenas TCR, posee un gran tamaño (44 aminoácidos en CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$ , 55 aminoácidos en CD3 $\epsilon$  y 113 aminoácidos en CD3 $\zeta$ ). En el dominio intracitoplasmático de estas cadenas CD3, radica la capacidad de transducción de señales al interior celular tras el reconocimiento antigénico. Dicha capacidad señalizadora reside en una secuencia altamente conservada denominada ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Los motivos ITAM son esencialmente dos residuos de tirosina (Y) separados entre sí por aproximadamente 18 aminoácidos, y están sometidos a fosforilaciones mediadas por quinasas asociadas al receptor (Latour S et al, 2001). Las cadenas CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  contienen un único motivo ITAM, mientras que CD3 $\zeta$  tiene tres (Love PE et al, 2000), de este modo, un complejo TCR/CD3 completo (TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$ ) contiene 10 motivos de este tipo. La secuencia canónica de los motivos ITAM es la siguiente: ...Yxxx[L/I]<sub>x<sub>7-11</sub></sub>Yxxx[L/I]... (Weiss A et al, 1994).

Cadena	TCR	Peso Molecular (kD)	Puentes de azufre <sup>a</sup>		Cromosoma	Región	Oligosacáridos		
			Intra	Inter			N-Gly <sup>b</sup>	O-Gly <sup>c</sup>	
TCR	TCRα	αβ	45-60	2	1 con β	14(q11-q12)	VJC	Sí (6)	Sí
	TCRβ	αβ	40-50	2	1 con α	7(q35)	VDJC	Sí (2)	Sí
	TCRγ	γδ	45-60	2	0-1 con δ	7(p14)	VJC	Sí (4)	Sí
	TCRδ	γδ	40-60	2	0-1 con γ	14(q11-q12)	VDJC	Sí (2)	Sí
CD3	CD3γ	αβ ó γδ	25-28	1	0	11(q23)		Sí (2)	No
	CD3δ	αβ ó γδ	20	1	0	11(q23)		Sí (2)	No
	CD3ε	αβ ó γδ	20	1	0	11(q23)		No	No
CD247	TCRζ	αβ ó γδ	16	0	1 con ζ	1		No	No

**Tabla I. Características de las cadenas (TCR y CD3) que componen el complejo TCR/CD3.** (a) Intra: Intracatenario; Inter: intercatenario (b) Sitios de N-glicosilación, se indica entre paréntesis el número de sitios (c) Sitios de O-glicosilación detectados en serina y treonina susceptibles de glicosilación.

### 1.2.1. El complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3.

Los últimos trabajos indican que la estequiometría más probable del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 es  $\alpha\beta/\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$ , que se ensamblaría por dímeros en ese orden (**Figura 3**). Aunque originalmente se describió que para la expresión de un complejo TCR/CD3 era necesaria la expresión de todas las cadenas (**Ohashi PS et al, 1985**), en células no T (Hela, 3T3) se observó que es posible la expresión en membrana de complejos sin CD3 $\delta$  o CD3 $\gamma$ , pero no sin CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , TCR $\alpha$  o TCR $\beta$ , tanto en humanos (**Kappes DJ et al, 1991**) como en ratón (**Szymczak AL et al, 2004**; y **D. Vignali comunicación personal**) (**Figura 4**). Este hecho también se ha observado en los propios linfocitos T, tanto humanos como murinos, deficientes de algunas de esas cadenas (**Arnáiz-Villena A et al, 1992**; **Dave VP et al, 1997**; **Hacks MC et al, 1998**). Además, los mutantes de Jurkat que carecen de CD3 $\gamma$  (JGN, Jurkat Gamma Negative) (**Von Essen M et al, 2002**), seleccionados en su día con objeto de que no expresaran el complejo TCR/CD3, no son útiles para definir el papel biológico de dicha cadena en la regulación del complejo (**Torres PS et al, 2003**). En la **Figura 5** se indican las posibles estequiometrías de los complejos incompletos.

En el modelo  $\alpha\beta/\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$  (**Figura 3**), las cadenas CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$ , pero no CD3 $\gamma$ , interaccionan directamente con la cadena TCR $\alpha$  mediante puentes salinos a nivel de la región transmembrana (TM), establecidos entre los residuos de carga positiva (Arg y Lys) de la cadena TCR $\alpha$  y los residuos de la carga negativa (ácido aspártico) de las citadas cadenas CD3 (**Blumberg RS et al 1990**, **Cosson P et al, 1991**; **Call ME et al, 2004**). Por su parte la cadena TCR $\beta$  se muestra más promiscua a la hora de establecer interacciones con las cadenas CD3 y se han descrito asociaciones de TCR $\beta$  con cada una de las cadenas CD3 (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ). Las interacciones TCR $\beta$ /CD3 $\delta$  parecen establecerse de forma muy similar a las descritas anteriormente con TCR $\alpha$  y CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$ , y suponen el establecimiento de contactos transmembranales entre un residuo de Lys (con carga positiva) de la cadena TCR $\beta$  y un aminoácido de carga negativa (ácido aspártico o glutámico) de la cadena CD3 $\delta$  (**Morley BJ et al, 1988**; **Call ME et al, 2004**). Sin embargo, las interacciones con las cadenas CD3 $\epsilon$  y CD3 $\gamma$  también requieren interacciones a nivel del dominio extracelular (**Manolios N et al, 1994**). Por su parte, la cadena CD3 $\zeta$  parece requerir la presencia de determinados residuos de su reducida región extracelular (**Bolliger L et al, 1997**), así como ciertos residuos de los dominios extracelulares (EC) de las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , próximos a la membrana, para

asociarse de forma correcta y estable al complejo TCR/CD3 (**Geisler C et al, 1992; Caspar-Bauguil et al 1994; Bäckström BT et al, 1996**),

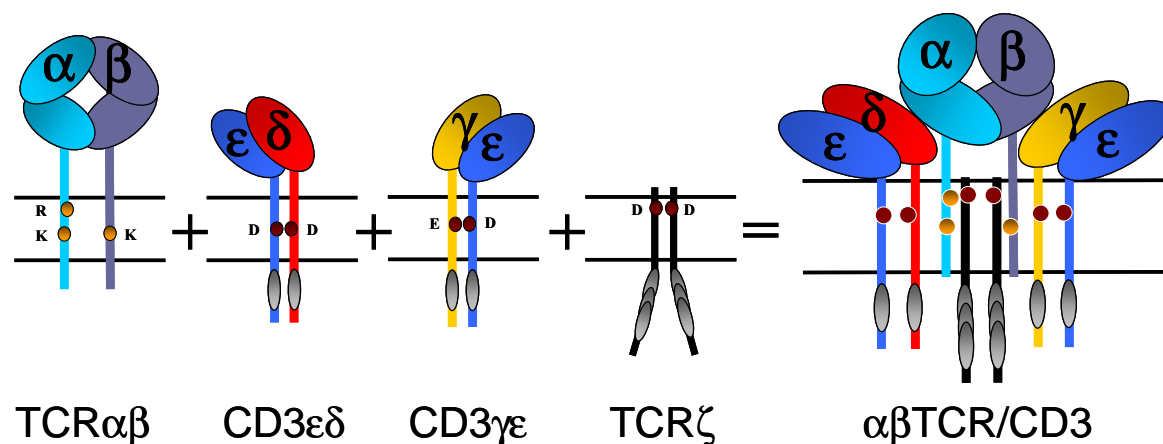
Por último, se ha descrito recientemente que el complejo TCR se comporta como un mecano-sensor anisotrópico convirtiendo la energía mecánica del cambio conformacional en una señal bioquímica específica tras el reconocimiento antigénico (**Kim ST et al, 2009**). Este mecanismo ha sido sugerido en base a las diferencias estructurales/topológicas observadas en los complejos TCR, a las diferencias de tinción proporcionadas por los anticuerpos monoclonales y al estudio de la sus capacidades funcionales.

Se ha demostrado mediante mutagénesis direccional las consecuencias funcionales de una asimetría en la cadena G en los ectodominios (dominios extracelulares) de las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$ . (**Kim ST et al, 2010**). De hecho la conformación de la cadena G en el ectodominio de la cadena CD3 $\gamma$  es crucial para la activación, el ensamblaje y la expresión del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3, no pudiendo este ectodominio ser sustituido por el de CD3 $\delta$  al presentar una conformación distinta. Las diferencias conformacionales observadas en la cadena G del dominio extracelular para ambas cadenas CD3 han sido observadas en humanos y otras especies. Estas diferencias proporcionan una topología diferencial en los heterodímeros CD3 y en la estructura cuaternaria del complejo TCR, lo que afecta sustancialmente a la capacidad de señalización/activación del complejo.

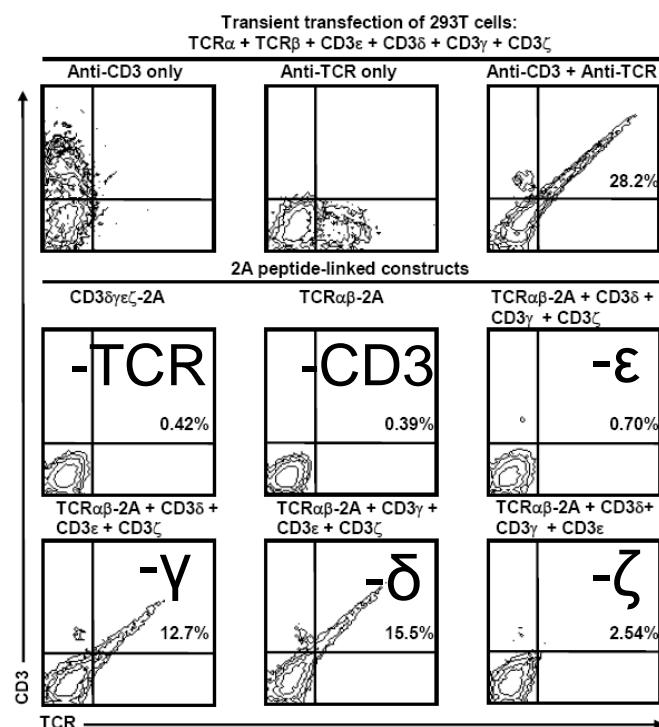
### 1.2.2. El complejo $\gamma\delta$ TCR/CD3.

El complejo  $\gamma\delta$ TCR/CD3, curiosamente, carece de CD3 $\delta$  en ratón y la estequiometría propuesta para este receptor es la siguiente:  $\gamma\delta/\gamma\epsilon\gamma\epsilon\zeta\zeta$ . Esto permite explicar por qué el desarrollo y el TCR de los linfocitos T $\gamma\delta$  no se ven afectados en ratones  $\delta^{-/-}$  (**Hayes SM et al, 2006**). Aunque en su momento se propuso una estequiometría similar para el complejo  $\gamma\delta$ TCR/CD3 humano, datos recientes sugieren que éste debe tener una estequiometría similar a la del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 (**Swamy M et al, 2007**). Así, los humanos deficientes en CD3 $\delta$  carecen de linfocitos T $\gamma\delta$  (**Dadi HK et al, 2003**). Sin embargo, los humanos deficientes en CD3 $\gamma$ , presentan valores casi normales de linfocitos T $\gamma\delta$  que además expresan más CD3 que los linfocitos T $\alpha\beta$  (**Recio MJ et al, 2007; Siegers GM et al, 2007**). Además, la cadena TCR $\delta$  humana, como ocurre con TCR $\beta$ , puede asociarse a los heterodímeros CD3 $\epsilon\gamma$  o CD3 $\epsilon\delta$

(Alibaud L et al, 2001). Estos datos apoyan la estequiometría  $\gamma\delta/\epsilon\delta\epsilon\gamma\zeta\zeta$  para las células T $\gamma\delta$  humanas, parecida por tanto a la de los linfocitos T $\alpha\beta$  humanos, como se ha corroborado recientemente por métodos bioquímicos (Swamy M et al, 2007).



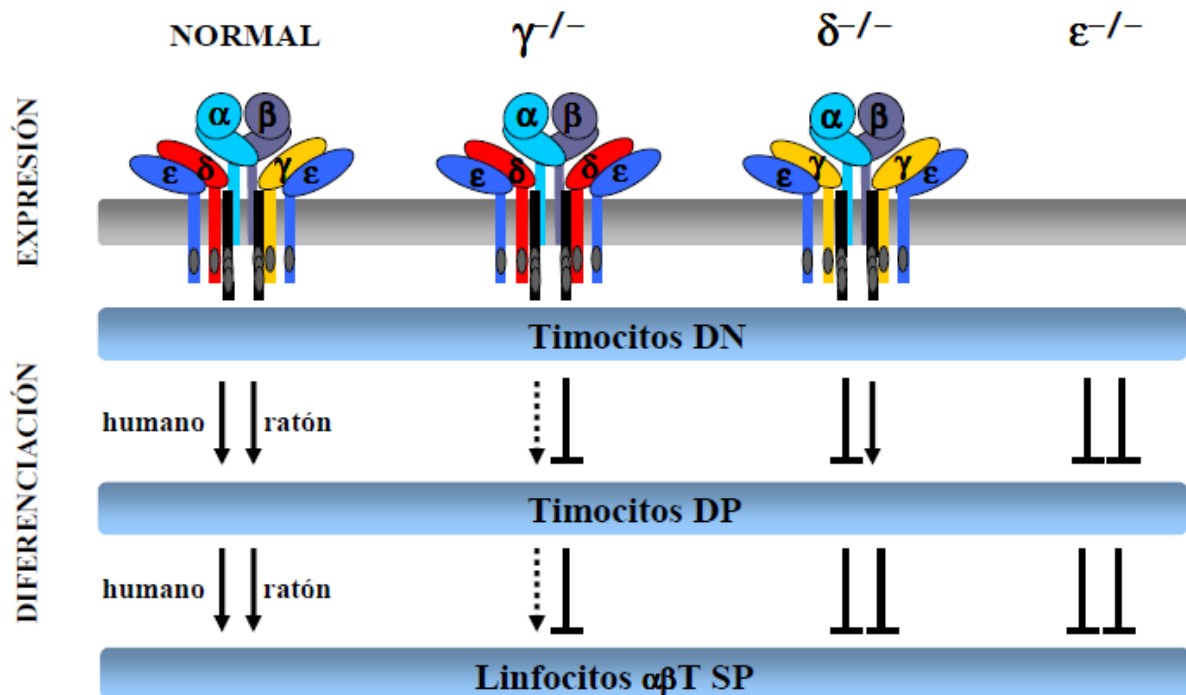
**Figura 3. Modelo propuesto de ensamblaje del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3.** Las interacciones salinas a nivel de la región transmembrana (R, Arginina; K, Lisina; D, Aspartato; E, Glutamato) son cruciales para el correcto ensamblaje del complejo TCR/CD3 (adaptado de Call ME et al, 2004; Recio MJ et al, 2007).



**Figura 4. La expresión del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 en células no -T humanas (293T) es posible cuando falta CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$ , pero no cuando falta otra cadena.**

En células no - T humanas (293T) que fueron transfectadas transitoriamente con diferentes construcciones del TCR y CD3 murinos por separado (fila superior), comparado con aquellas en las que faltan las cadenas indicadas del complejo (panel medio e inferior). Posteriormente, fueron analizadas mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos anti-TCR y anti-CD3 (adaptado de Szymczak AL et al, 2004).





**Figura 5.** Representación esquemática de las posibles estequiometrías del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 (o pre- $\alpha\beta$ TCR/CD3) en condiciones normales o en ausencia de alguna de las cadenas CD3(arriba) y sus efectos diferenciales observados en el desarrollo linfóide T en humano y ratón (abajo). La flecha continua ( $\rightarrow$ ) indica selección normal, la flecha discontinua ( $--\rightarrow$ ) indica un bloqueo parcial y el bloqueo completo en el desarrollo viene representado como ( $\perp$ ). Las dobles negativas (DN,  $CD4^{-}CD8^{-}$ ), dobles positivas (DP,  $CD4^{+}CD8^{+}$ ) y simples positivas (SP,  $CD4^{+}CD8^{-}$  o bien  $CD4^{-}CD8^{+}$ ) (Adaptado de Pérez-Flores V et al, 2006).

### 1.3. Desarrollo de los linfocitos T.

La maduración intratímica de células T se inicia con la llegada de las células madre hematopoyéticas (HSC) procedentes del hígado fetal o de la médula ósea al timo. Éstas sufren un proceso de diferenciación caracterizado por la expresión diferencial de distintos marcadores de superficie, distintos estados de proliferación y cambios en la funcionalidad celular. Los puntos clave en el desarrollo de los linfocitos T son el compromiso hacia un linaje, los procesos de selección y la migración tímica (Gill J et al, 2003; von Boehmer H et al, 2004).

La maduración de las células T comienza en la corteza del timo, donde se localizan los precursores más inmaduros que se caracterizan por presentar un fenotipo  $CD44^{+}$   $c\text{-kit}^{+}$  (en ratón) que son marcadores típicos de células inmaduras hematopoyéticas. Este estadio inicial es denominado doble negativo (DN) puesto que no expresan CD4 ni CD8, y si sólo expresan  $CD44^{+}$  se les denomina DN1. Esta etapa se divide en cuatro estadios (DN1-4). A medida que migran hacia la corteza y entran en contacto con las células tímicas, se produce una proliferación masiva y la expresión en superficie de CD24 y CD25, a estas células se les

denomina DN2 con el fenotipo ( $CD44^+ c\text{-kit}^+ CD24^+ CD25^+$ ). Durante este estadio (DN2) se produce el reordenamiento de los genes V, D y J que codifican las cadenas  $TCR\beta$ ,  $TCR\gamma$  y  $TCR\delta$  de modo que las células resultantes tras el reordenamiento pueden expresar un  $TCR\gamma\delta$  o bien un pre-TCR constituido por la cadena  $TCR\beta$  asociada covalentemente a una cadena invariable pre-T $\alpha$  (Saint-Ruf C et al, 1994; von Boehmer H, 2005).

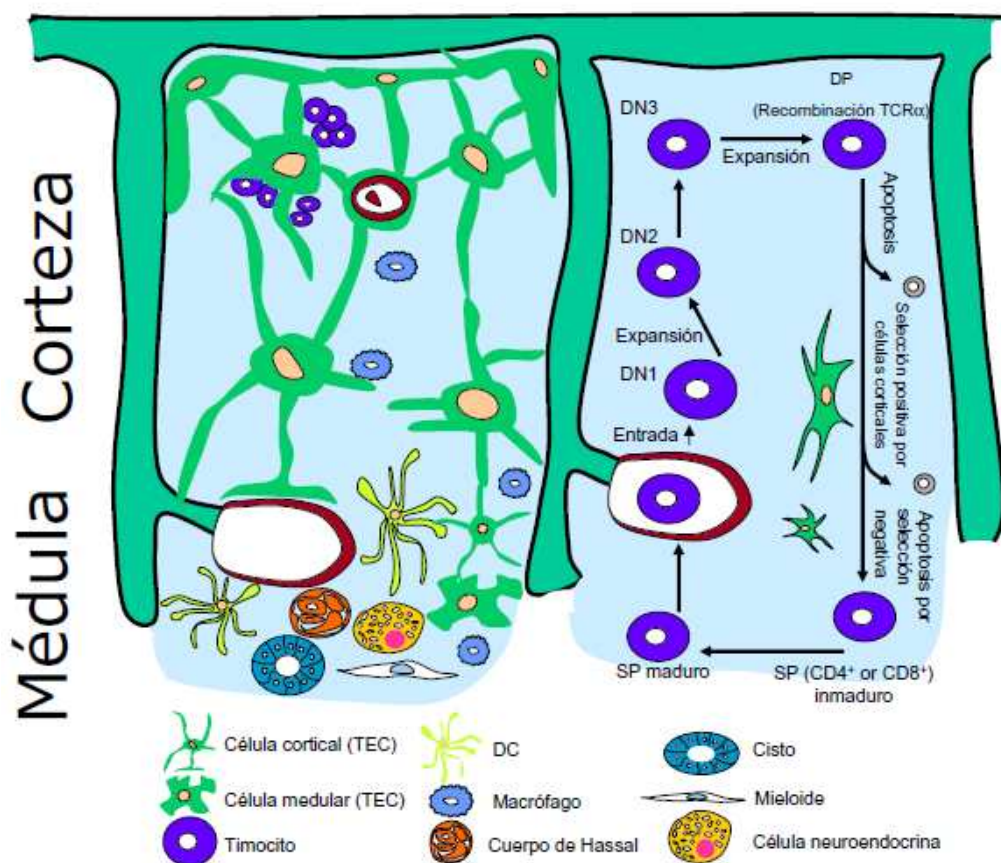
Tras el reordenamiento de la cadena  $TCR\beta$ , se produce la pérdida de expresión de  $CD44$  y  $c\text{-kit}$  ( $CD44^- c\text{-kit}^- CD24^+ CD25^+$ ) cuando concluye el estadio DN3. Durante este estadio, son eliminadas todas las células que no expresen un  $TCR\gamma\delta$  o bien un pre-TCR funcional (constituido por una cadena  $TCR\beta$  y una cadena invariable pre-T $\alpha$ ). La etapa DN3 es crítica puesto que marca la transición entre los TCR independientes y los TCR dependientes. Es decir, si los genes reordenados del TCR no producen una cadena  $TCR\beta$ , o en su defecto las cadenas  $TCR\gamma$  o  $TCR\delta$ , las células no sobrevivirán. Por otra parte, las células que expresen correctamente las cadenas  $TCR\gamma$  y  $TCR\delta$  durante la etapa DN3, darán lugar a células  $T\gamma\delta$  maduras (Figura 9).

La señalización del pre-TCR es, en principio, similar a la observada en el TCR (Love PE, 2003), aunque requiere la señalización por Notch 1 (Ciofani M et al, 2004). La señalización por el pre-TCR produce la inhibición del reordenamiento de cadenas  $TCR\beta$  adicionales. Este proceso se conoce como selección  $\beta$  y permite la selección de células con una única cadena de  $TCR\beta$  productiva. Una vez concluida esta selección  $\beta$ , las células comienzan a proliferar y se diferencian en células DN4, y posteriormente comienzan a expresar los correceptores  $CD4$  y  $CD8$ . A estos timocitos se les denomina dobles positivos (DP) con el fenotipo ( $CD44^- CD25^- CD4^+ CD8^+$ ) y son los precursores de las células T $\alpha\beta$  convencionales. Durante esta transición de DN a DP es cuando los transcritos de la cadena  $TCR\alpha$ , que inicia su proceso de reordenamiento, comienzan a ser detectables.

A partir de este estadio (DP), las células comienzan el ensamblaje de la cadena  $TCR\alpha$  y su expresión en la membrana junto con la cadena  $TCR\beta$ . Estos timocitos DP entran en un nuevo ciclo de selección (positiva y negativa) en el cual sus TCR son chequeados en términos de afinidad/avidez. La mayoría de las células DP morirán y sólo unas pocas serán seleccionadas para seguir la maduración y convertirse en células T maduras  $CD4^+$  o  $CD8^+$

simple positivas (SP) (**Figura 7**). Los timocitos DP que expresen un receptor restringido para MHC de clase I ó II propio producen una señal de inhibición que reprime los genes de la recombinasa (RAG), que induce la supervivencia a largo plazo, y que impulsa la migración hacia la corteza y la diferenciación hacia células T maduras. Todo este proceso se denomina selección positiva y se inicia en timocitos corticales (**Starr TK et al, 2003**).

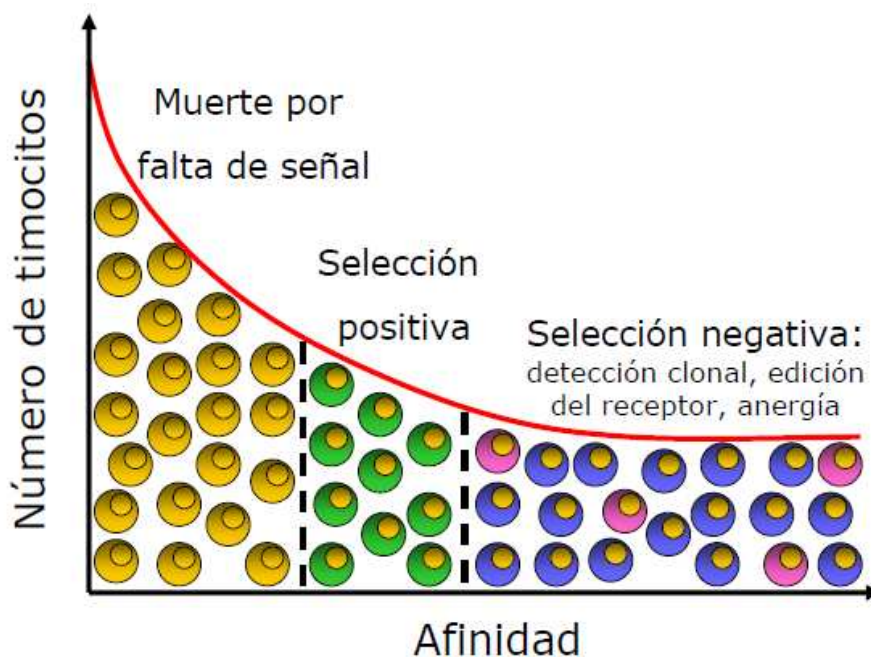
La selección positiva es un proceso crucial para enriquecer el timo en precursores de células T restringidos para el MHC propio. Si los timocitos se unen al MHC propio de una elevada afinidad, son eliminados mediante delección clonal, de este modo se eliminan las células autorreactivas. A este proceso se le conoce como selección negativa y es el responsable de la eliminación de los progenitores de células T con alta afinidad para autoantígenos. La selección negativa es imprescindible para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica central (**Hogquist KA et al, 2005**).



**Figura 6. Representación esquemática del desarrollo y diferenciación de las células T en el timo.** Las células epiteliales tímicas (TEC) proporcionan el soporte estructural y funcional para el desarrollo de los timocitos. Las células hematopoyéticas fetales (HSC) se adentran en el timo a través del hilio cortico-medular, donde comienzan su expansión y su desarrollo. Los timocitos que se encuentran restringidos por un MHC se inducen y proliferan en la corteza tímica. Aunque la selección negativa es debida a la unión excesiva o fallida con un MHC y sucede en la corteza, es principalmente en la médula donde se eliminan los timocitos autorreactivos. Finalmente, los linfocitos simples positivos (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) alcanzan su maduración en la médula

donde finalmente serán exportados a sangre periférica. Abreviaturas (DN, Dobles Negativas; DP, Dobles Positivas; SP, Simples Positivas; DC, Dendríticas).

El desarrollo de los timocitos se encuentra regulado por la afinidad del TCR por los ligandos MHC-péptidos, proponiéndose que el TCR interpreta la fuerza de la señal intracelular tras el contacto (Siggs OM et al, 2006) (Figura 7). Los timocitos DP que presentan una afinidad muy baja son eliminados por falta de supervivencia. Si el TCR presenta una afinidad baja por los MHC-péptidos endógenos, los progenitores sobreviven y se diferencian hacia la selección positiva. Sin embargo, si los timocitos presentan una afinidad muy alta por los MHC cargados con péptidos endógenos, pueden morir por selección negativa o bien sufrir procesos de edición del receptor, anergia o desarrollarse hacia una célula reguladora. En el caso de la edición del receptor, el reconocimiento por el TCR del MHC-péptido endógeno provoca un segundo reordenamiento de los genes del TCR de forma que la cadena TCR $\alpha$  de alta afinidad sea reemplazada por la recién creada.



**Figura 7. Modelo propuesto de afinidad en la selección positiva y negativa.** El criterio de selección de los timocitos está basado en la afinidad del TCR por péptidos presentados por las moléculas de histocompatibilidad (MHC). Si la afinidad es muy baja o no reconocen los péptidos presentados por las moléculas de histocompatibilidad son eliminados por falta de señal. Si la afinidad es baja por los complejos MHC-péptido, el timocito sobrevive y prolifera (*selección positiva*). Por último, si la afinidad es alta por el complejo MHC-péptido, los timocitos son eliminados por apoptosis (*selección negativa*). En la selección negativa, además de la deleción clonal, se produce anergia, edición del receptor y desarrollo hacia células T reguladoras (Tregs).

## 2. Transducción de señales vía TCR/CD3.

### 2.1. Señalización intracelular.

La respuesta inmunitaria de los linfocitos T se encuentra relacionada con la activación del complejo TCR/CD3 mediante el reconocimiento antigénico. Una vez activado el complejo TCR/CD3, la célula T desencadena la estimulación de múltiples rutas de señalización intracelular, reguladas por un delicado equilibrio de fosforilación y desfosforilación (**Weiss A et al, 1994; Cantrell DA, 1996; Samelson LE, 2002; Mustelin T et al, 2003**). La cascada de intermediarios de activación, generada tras la estimulación, culmina en diversos eventos efectores como la reorganización del citoesqueleto, la producción de citoquinas, la diferenciación y la proliferación celular.

La capacidad señalizadora del complejo TCR/CD3 radica en los motivos ITAM presentes en el dominio intracelular de las cadenas CD3 (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ) y CD3 $\zeta$  (CD247). Actualmente, existe una gran controversia acerca de la contribución relativa de cada una de las cadenas CD3 en la transmisión de señales, y el por qué de la existencia de varias cadenas CD3 en un mismo complejo TCR/CD3. Para entender el significado fisiológico de la existencia de los diferentes motivos ITAM – al menos 10 en un mismo receptor-, se han propuesto dos teorías que tratan de explicar su funcionalidad.

La primera teoría propone la redundancia funcional, es decir que los motivos ITAM de las diferentes cadenas CD3, ejercen un papel amplificador o cuantitativo de la señal (**Irving BA et al, 1993; Pitcher LA et al, 2003**). Esta teoría podría explicar cómo a partir de un bajo número de interacciones TCR-ligando, es posible generar una señal óptima de activación. Por otra parte, las secuencias ITAM aisladas a partir de CD3 $\epsilon$  y CD3 $\zeta$ , expresadas en quimeras con receptores de superficie que carecen de los otros componentes de CD3, son suficientes para la transmisión de señales de activación de la célula T (**Irving BA et al, 1991; Letourneur F et al, 1992; Eshhar Z et al, 1993**). Además, cuando una cadena CD3 $\zeta$  es reemplazada por una cadena CD3 $\zeta$  truncada, que carece de dominio intracitoplasmático, el complejo TCR/CD3 resultante es capaz de mediar señales de activación, lo cual indica que la función de esta cadena puede ser suplida totalmente por las otras moléculas CD3 (**Wegener AM et al, 1992**). Además, se sabe que las secuencias ITAM localizadas en las distintas cadenas CD3 funcionan mediante mecanismos de interacción directa con dominios SH-2 (*Src*

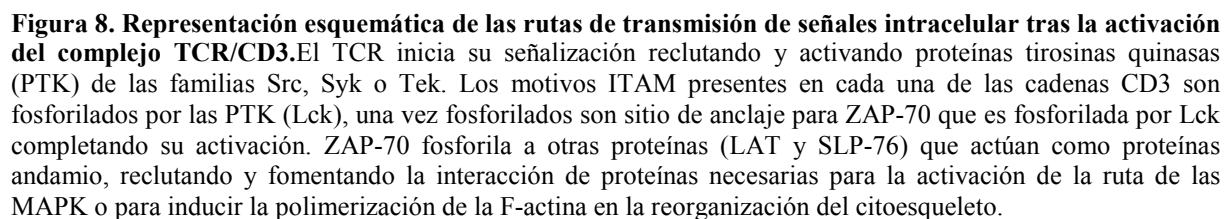
*Homology* 2) de otras proteínas señalizadoras localizadas más tardíamente en el proceso global de señalización, y se ha demostrado que hay solapamiento de unión a los diferentes ITAM, ya que ZAP-70 puede unirse a dichas regiones tanto en la cadena CD3 $\zeta$  como en la cadena CD3 $\epsilon$  (Chan AC et al, 1992; Straus DB et al, 1993). Sin embargo, las secuencias ITAM presentan una gran diversidad en sus regiones de unión a dominios SH-2, y de hecho se sabe que las afinidades de unión entre los distintos ITAM y ZAP-70 son muy distintas (Ravichandran KS et al, 1993; Exley M et al, 1994; Isakov N et al, 1995).

La segunda teoría aboga por la calidad de la señal, interpretando la señal emitida por el complejo TCR/CD3 de modo cualitativo y no cuantitativo, esta teoría está basada en la especialización de funciones. De este modo, propone que a través de la estimulación del complejo TCR/CD3, los distintos motivos ITAM promueven señales diferentes. Esta teoría justifica los hallazgos encontrados en los individuos deficientes en CD3 $\gamma$  (Pérez-Aciego P et al, 1991; Pacheco-Castro A et al, 1998; Torres PS et al, 2002). En cualquier caso, ninguna de las dos teorías es mutuamente excluyente, y es muy plausible que para determinadas vías de señalización, las cadenas CD3 actúen de forma redundante (señal cuantitativa) y para otras vías, tengan una contribución específica (señal cualitativa) e insustituible.

## 2.2. Las proteínas-tirosina- quinasas (PTK).

Una vez transcurrido el reconocimiento antigénico en la célula T, y tras la estimulación del complejo TCR/CD3, se produce la activación de numerosas proteínas-tirosina-quinasas (PTK), algunas asociadas a CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y otras a CD3 con objeto de reclutar y fosforilar a diferentes intermediarios de la señalización (**Figura 8**). Las cadenas CD3 son las encargadas de propagar la señal de activación mediante el reclutamiento y la activación de diferentes proteínas citosólicas y de proteínas adaptadoras que integran, regulan y diversifican la señal original (Chraven B et al, 1999; Kane L et al, 2000).

El inicio de la transmisión intracelular de señales, a través del complejo TCR/CD3, supone la participación de proteínas tirosina-quinasas (PTK). Entre las PTK más relevantes se encuentran miembros de las familias Src (Lck y Fyn) y Syk (ZAP-70). A nivel estructural, se caracterizan por presentar dominios de unión SH-2 y SH-3 (Latour S et al, 2001) a través de

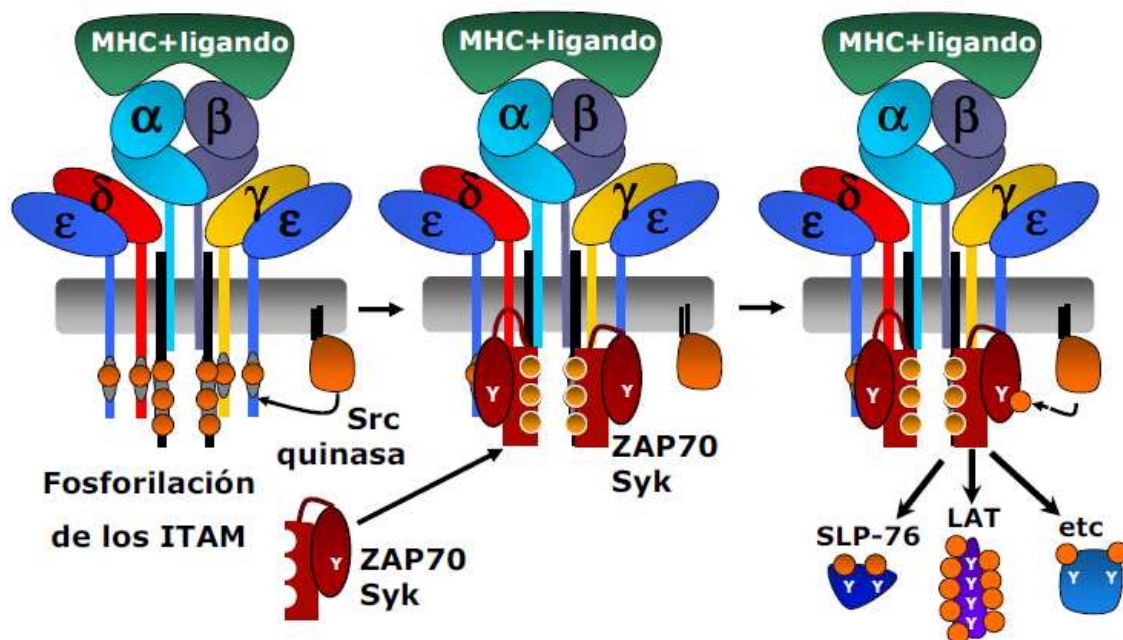


28



La proteína tirosina quinasa **Fyn** parece tener un papel en la señalización de las células T aunque de menor importancia. Los ratones deficientes en Fyn no muestran ninguna alteración en el desarrollo tímico, salvo en células iNKT (Eberl G et al, 1999), pero si en la población de células T maduras (Appleby MW et al, 1992).

Una de las proteína-tirosina-quinazas (PTK) más importantes es **ZAP-70** (*Zeta-associated-protein*) -de 70kD- que pertenece a la familia Syk de las PTK y se expresa en células T y NK. La proteína ZAP-70 juega un papel crítico en la señalización de las células T en respuesta al reconocimiento antigénico, reclutando a los ITAM fosforilados de la cadenas CD3 $\zeta$  del complejo TCR/CD3 (**Figura 9**). Su actividad catalítica y funcional reside en gran medida en la fosforilación de las tirosinas presentes en los diferentes dominios de su estructura por miembros de la familia Src – quinazas (Lck). La ausencia de ZAP-70 tras la estimulación del complejo TCR/CD3 conlleva defectos en el patrón de fosforilación de tirosinas, movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , secreción de IL-2, expresión de CD69 y proliferación de células T. Además, ejerce un papel relevante en la selección tímica dado que su ausencia produce el bloqueo de los timocitos DP ( $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ ).



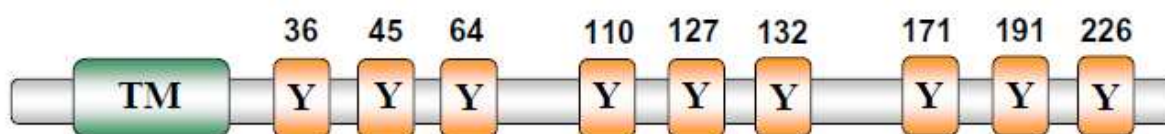
**Figura 9. Fosforilación intracelular del complejo TCR/CD3 mediado por proteínas-tirosina-quinazas (PTK).** Tras el reconocimiento antigénico del complejo TCR/CD3, se produce la fosforilación de los motivos ITAM de las cadenas CD3 por PTK de la familia Src (Lck, Fyn). Una vez fosforilados, la proteína ZAP-70 de la familia Syk de PTK es capaz de reconocer los motivos ITAM fosforilados de la cadena CD3 $\zeta$ . Una vez unida, es fosforilada y activada, de este modo es capaz de fosforilar a otras proteínas de señalización (LAT, SLP-76, etc...).



### 2.3. Proteínas adaptadoras (LAT).

Numerosas proteínas adaptadoras están relacionadas con la transmisión de señales en las células T tras la activación de complejo TCR/CD3. Una de esas proteínas adaptadoras es LAT (*Linker of activation T cells*), una proteína integral de membrana de 36-38kD, en cuyo tallo intracitoplasmático presenta varios motivos de fosforilación en tirosinas, al menos nueve descritos en humanos (Zhang W et al, 1998) (Figura 10). La proteína LAT se expresa en células T y NK preferentemente, aunque también se ha detectado su expresión en mastocitos, megacariocitos y plaquetas (Weber F et al, 1993; Zhang W et al 1998), sin embargo no se ha detectado su expresión en linfocitos B u otras células. Se caracterizan por carecer de actividad quinasa, y presentar un elevado número de dominios de unión SH-2 y SH-3, lo cual les permite el reclutamiento de diferentes intermediarios de señalización. La proteína LAT es sustrato de ZAP-70 y es rápidamente fosforilada tras el reconocimiento antigénico del complejo TCR/CD3 (Figura 9).

#### LAT - (36-38kD)



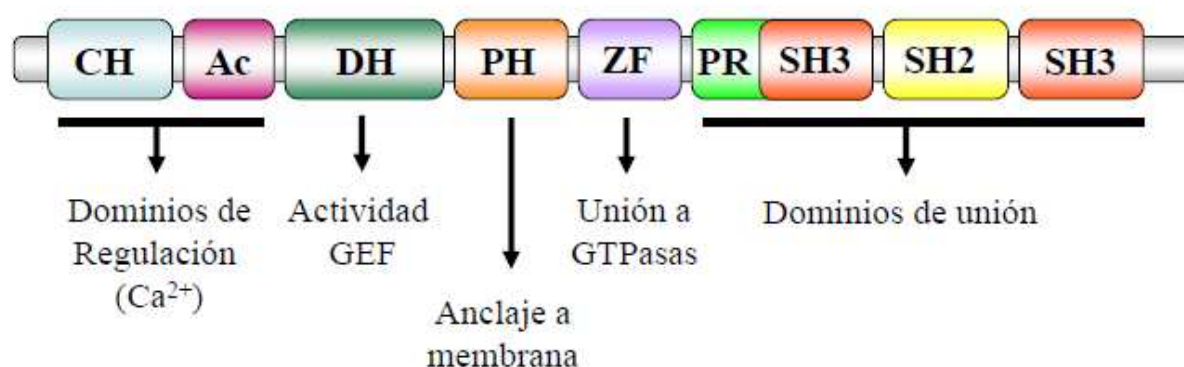
**Figura 10. Potenciales sitios de fosforilación de tirosinas en la proteína adaptadora LAT (Zhang W et al, 1998).** Se han descrito hasta 9 tirosinas susceptibles de fosforilación en el dominio citoplasmático de la proteína adaptadora LAT. Región transmembrana: (TM). Adaptado de Cho S et al, EMBO Journal (2004) 23, 1441.1451.

Tras la activación del complejo TCR/CD3, la proteína LAT es fosforilada directamente por ZAP-70. Una vez activada, la proteína LAT actúa como proteína andamio, lo cual le permite el reclutamiento directo o indirecto de buena parte de la maquinaria intracelular. El reclutamiento de las diferentes proteínas se realiza a través de sus numerosos dominios de unión SH-2/SH-3 o bien a través de otras moléculas adaptadoras, necesarias para la activación de las células T por el TCR. La capacidad de reclutamiento de LAT a un elevado número de proteínas de señalización convierte esta proteína en un nexo de unión entre los eventos más proximales al complejo TCR/CD3 (PTKs), otros eventos intermediarios como el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , la vía Ras de activación, la activación de diversos factores de transcripción (NFAT, NF- $\kappa$ B; AP-1), y otros más tardíos como la reorganización del citoesqueleto (Bunnell SC et al, 2001) y la proliferación celular.

## 2.4. Proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (Vav).

**Vav** es una proteína de 95kD perteneciente a la familia de proteínas Dbl. Se expresa en células del sistema hematopoyético y en trofoblastos. Las proteínas de la familia Dbl se caracterizan por presentar un dominio DH (*Dbl homology*), con actividad GEF (Factor intercambiador de nucleótidos de guanina) sobre diferentes GTPasas (Rac, Rho, Cdc-42), seguido de un dominio PH (*Plextrin homology*) que le permite anclarse a membrana. Además, presentan dominios de unión SH-2 y SH-3 (**Figura 11**).

### VAV - (95kD)



**Figura 11. Representación esquemática de los diferentes dominios y su función en la proteína Vav.** Dominio CH (Calponin Homology) relacionado con la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ ; Dominio Acídico (Ac) presenta tyrosinas muy conservadas que sugieren un papel regulador; Dominio Dbl (DH) caracterizado por actividad GEF; Dominio ZF (Dedos de zinc) que le permite unirse a GTPasas; Dominio rico en prolinas (PR) con capacidad de unión y Dominios SH-2 y -3 (Homología Src) que permiten a Vav interaccionar con diferentes intermediarios de señalización como ZAP-70, TCR $\zeta$  y SLP76 entre otras proteínas.

Tras la estimulación del complejo TCR/CD3, la proteína Vav resulta rápidamente fosforilada en residuos de tirosina, en un proceso en el que es requerido ZAP-70. Una vez fosforilada, la proteína Vav participa, mediante la activación de proteínas Rho/Rac, en la activación de diferentes intermediarios de señalización como JNK y p-38 MAPK, y factores de transcripción como NFAT. Los trabajos realizados en ratones deficientes en Vav, así como también en células T Jurkat deficientes en Vav, han puesto de manifiesto la importancia de esta proteína en la selección tímica, la activación de la célula T, la agregación del complejo TCR/CD3 y la reorganización del citoesqueleto (**Paccani SR et al, 2005**).

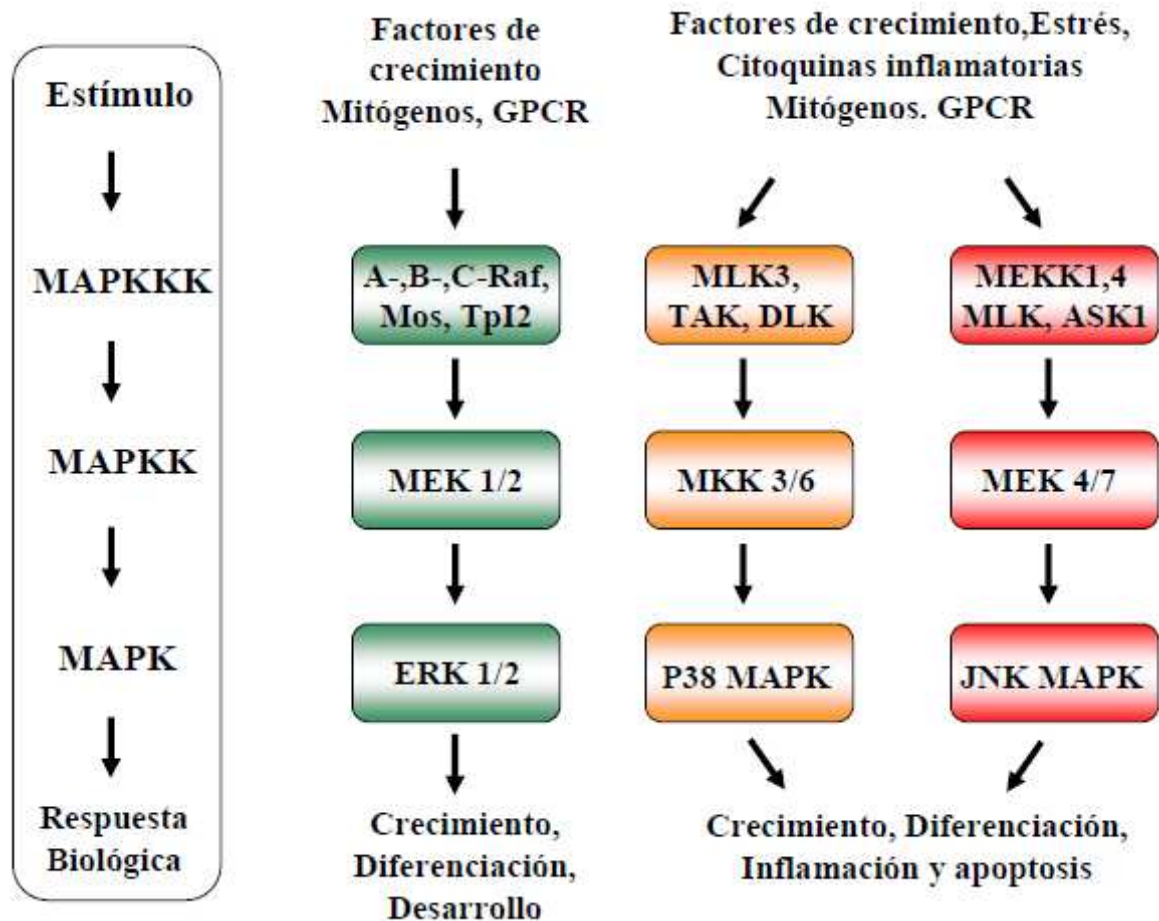
## 2.5. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

La cascada de activación de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) ejerce un papel crítico en la regulación génica que controla los diferentes procesos vitales de diferenciación, supervivencia y activación celular. Las MAPK comprenden una familia de quinasas serina/treonina muy conservadas durante la evolución, que son activadas tras la fosforilación de dos residuos con el motivo [...Thr-X-Tyr...], donde X es Glu (E) para ERK, Pro (P) para JNK y Gly (G) para p-38. La activación de las MAPK se divide en tres etapas, la primera etapa se produce a nivel de la membrana y proximidades (activación del complejo TCR/CD3), la segunda en el citosol (activación de la cascada enzimática) y la última se localiza en el núcleo (activación de diferentes factores de transcripción).

Existen diferentes rutas de activación de las MAPK entre las cuales destacan las siguientes como fundamentales : a) Ruta de ERK1/2 relacionada con la proliferación y diferenciación celular b) Ruta de JNK c) Ruta de p-38 relacionada con el estrés celular (inflamación y apoptosis).

- Ruta de ERK (Quinasa Regulada por señales Extracelulares). ERK es una proteína con dos isoformas ERK-1 y ERK-2, de 44 y 42 kD respectivamente, pertenecientes a la familia de las MAPK. Son rápidamente fosforiladas tras la activación del complejo TCR/CD3. Se encuentran relacionadas con la proliferación y diferenciación celular, y son capaces de translocarse al núcleo donde fosforilan diferentes factores de transcripción regulando la expresión génica.
- Ruta de las JNK (Quinasa Reguladora de c-Jun). JNK es una proteína que presenta dos isoformas JNK-1 y JNK-2, también pertenecientes a la familia de las MAPK. Son fosforiladas tras la activación del complejo TCR/CD3, aunque esta vía puede ser estimulada por otros factores como citoquinas, receptores acoplados a proteínas G, factores de crecimiento o condiciones de estrés. Estudios realizados en ratones deficientes en esta vía ponen de manifiesto su importancia en la producción de diferentes citoquinas como IL-2 o INF- $\gamma$ . De igual modo que el resto de proteínas de la familia de las MAPK, son proteínas capaces de translocarse al núcleo y regular la expresión génica con la activación de diferentes factores de transcripción.

- Ruta de p-38. La proteína p-38 (38kD) pertenece a la familia de las MAPK. Se fosforila en condiciones de estrés celular (inflamación y apoptosis). Aunque se han descrito varias isoformas ( $\alpha, \beta, \gamma$  y  $\delta$ ) para esta proteína quinasa, la que se encuentra relacionada con la activación del complejo TCR/CD3 es la isoforma p-38 $\alpha$ .



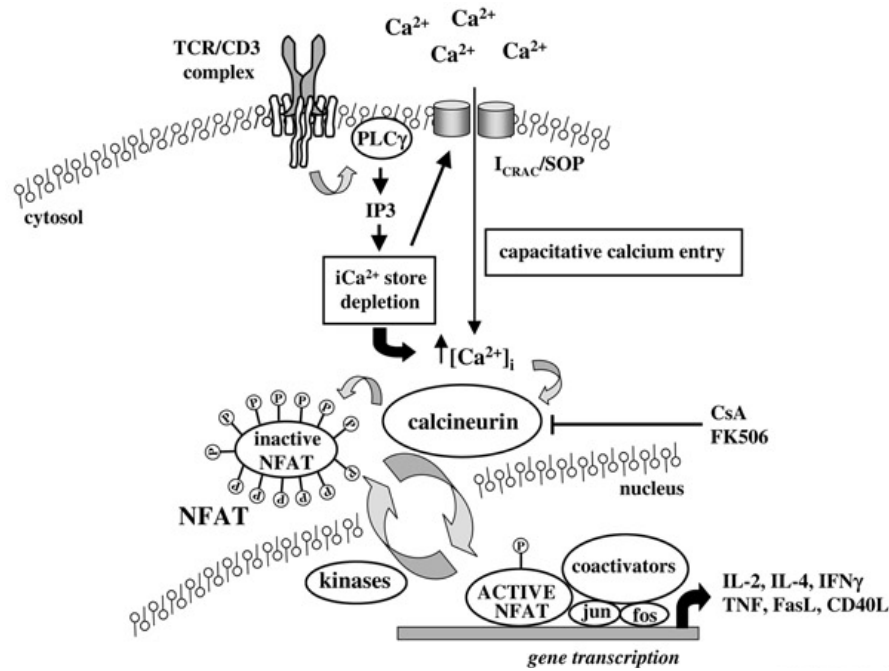
**Figura 12. Representación esquemática de las cascadas de señalización de las MAPK.** Las proteínas MAPK se organizan jerárquicamente en módulos de tres niveles. En primer lugar, las MAPKs son fosforiladas y activadas por quinasas MAPK (MAPKKs) que a su vez son fosforiladas y activadas por MAPKK-quinasas (MAPKKKs). Las MAPKKKs a su vez son activadas por la interacción con la familia de GTPasas y/o otras quinasas que conectan el módulo de activación de las MAPK a los receptores de superficie celular o los estímulos externos.

## 2.6. Factores de transcripción (NFAT).

El factor de transcripción NFAT (Factor Nuclear de células T activadas) se identificó en un principio en células T como un complejo inducible que se unía al elemento de respuesta a antígeno en el promotor del gen de la IL- 2, y cuya unión al DNA y efectos transactivadores estaban bloqueados por las drogas inmunosupresoras Ciclosporina A (CsA) y FK5061. En los últimos años, se ha identificado la presencia de miembros de la familia NFAT en distintos tipos celulares, dentro y fuera del sistema inmune, donde regulan la expresión de numerosos genes entre los que se encuentran los que codifican las citoquinas (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) y los receptores de superficie (FasL, CD40L) (Crabtree GR et al, 2002; Rao A 2009).

La activación de múltiples receptores extracelulares, entre ellos el complejo TCR/CD3, originan incrementos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular lo que conduce a la activación de la fosfatasa calcineurina (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina) que desfosforila a NFAT (**Figura 13**). La translocación al núcleo, el aumento de afinidad para unirse al DNA y la inducción de la actividad transcripcional de NFAT se inician con esta desfosforilación que promueve cambios conformacionales en el factor permitiendo la exposición de sus secuencias de localización nuclear (NLS). La secuencia consenso de unión con el DNA es GGAAAAT, aunque los sitios de unión contenidos en los promotores de genes tan importantes como la IL-2, FasL y CD69 suelen diferir en alguna base.

Finalmente, el NFAT se transloca al núcleo acompañado con la calcineurina, la cual continúa desfosforilando y activando a NFAT mientras las señales de calcio se mantienen (**Figura 13**). En estas condiciones, las distintas quinasas activadas fosforilan al factor e inducen la exportación de NFAT al citoplasma. Así, el balance entre la actividad fosfatasa de la calcineurina, dependiente de los niveles de calcio disponibles y de las quinasas implicadas parece regular la localización celular de NFAT.



**Figura 13. Modelo propuesto sobre la regulación y activación de NFAT.** En células en reposo, NFAT se encuentra fosforilado en el citoplasma. Tras la activación del complejo TCR/CD3, se produce un incremento del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y se activa la calmodulina (CaM) que se une a la calcineurina (CnA/CnB) y la activa. La calcineurina activada desfosforila a NFAT, proceso que conduce a la exposición de las secuencias de localización nuclear (NLS) y a la entrada del factor al núcleo. Esta entrada la realiza NFAT acompañado con la calcineurina, que mantiene el factor desfosforilado en el núcleo lo que permite la transcripción de múltiples genes dependientes de NFAT mientras se mantienen los niveles de calcio. Cuando el calcio intracelular desciende, la calcineurina se desactiva y varias quinasas fosforilan al factor, promoviendo así su exportación al citosol (Adaptado de Cope AP, 2002).

## 2.7. Reorganización del citoesqueleto.

La activación del complejo TCR/CD3 tras el reconocimiento de antígenos, presentado mayoritariamente por las moléculas de histocompatibilidad (MHC), de las células presentadoras de antígeno (APC) desencadena una rápida reorganización del citoesqueleto de las células T (**Fuller CL et al, 2003**). Dicha reorganización permite la unión T-APC mediante la distribución de moléculas de superficie en ambas células, la liberación de citoquinas y mediadores citotóxicos en el sitio del estímulo de la célula T.

Se ha descrito en células T numerosas proteínas que controlan el proceso de polimerización y despolimerización de actina durante la activación del complejo TCR/CD3. En el proceso de polimerización, la actina monomérica y globular (G-actina) es capaz de unirse a ATP y ADP y polimerizar para formar actina filamentosa (F-actina). El bloqueo de este proceso de polimerización de la F-actina así como de las proteínas involucradas en dicha

polimerización conlleva severos defectos en el desarrollo de la sinapsis inmunológica y en consecuencia en la activación de las células T.

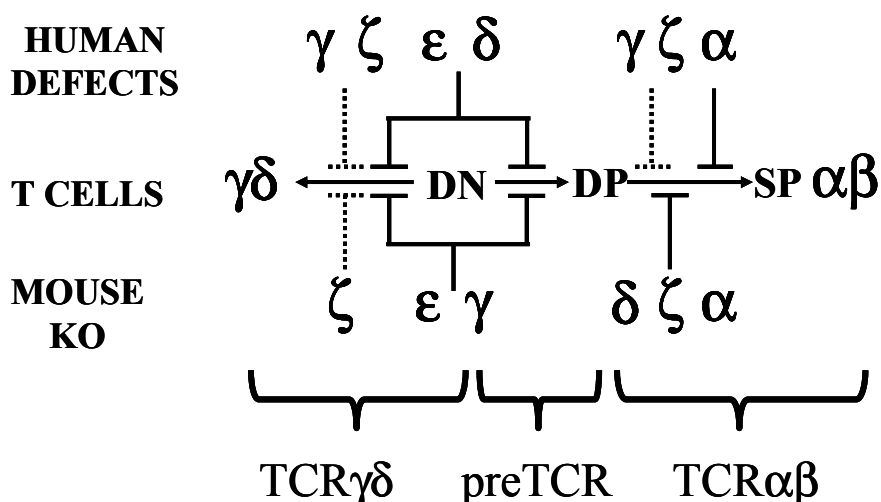
La interacción específica del antígeno con los receptores TCR/CD3 de las células T da lugar a la formación de una región de contacto especializada denominada sinapsis inmunológica o grupo de activación supramolecular (SMAC). La formación de la sinapsis es un proceso activo y dinámico que requiere la presencia del antígeno y en el que se encuentran involucradas diferentes moléculas (TCR, MHC, CD4, CD8, LFA-1 etc...).

La activación de las células T conlleva la compartimentalización del TCR y de las moléculas de señalización asociadas a dicho receptor. En la fase inicial de la sinapsis inmunológica, las moléculas de adhesión celular, como ICAM-1 en las APC y LFA-1 en las células T, establecen contacto en una zona central rodeada por un anillo de contacto íntimo entre MHC y TCR. Al cabo de unos minutos, el complejo TCR migra hacia la zona central generando una sinapsis madura, dicha zona central (cSMAC) se encuentra enriquecida en TCR, CD2, CD28 y CD4 e intracelularmente se encuentran las proteínas citoplasmáticas Lck, Fyn y PK $\theta$ . Rodeando el anillo central se localiza una región periférica (pSMAC) que contiene CD45, LFA-1 y talina. Durante la estimulación del complejo TCR, la activación de muchas proteínas-tirosinas-quinasas, proteínas adaptadoras y GTP-asas preceden la formación de una correcta sinapsis inmunológica.

### 3. Las deficiencias de CD3.

#### 3.1. Deficiencias completas.

El receptor del linfocito T es un complejo multimérico integrado por diferentes cadenas entre las cuales las cadenas variables TCR (TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ ) son las encargadas del reconocimiento antigénico mientras que las cadenas invariantes CD3 ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\zeta$ ) son responsables del ensamblaje y la expresión del complejo TCR/CD3 (Call ME et al, 2004) así como de la señalización intracelular (Alarcón B et al, 2003). La falta de alguna de las cadenas CD3 causa en humanos un grupo de inmunodeficiencias del linaje T, que en el caso de las deficiencias completas de CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$  provocan una severa linfopenia selectiva del linaje T con grave defecto de expresión del complejo TCR/CD3 en membrana (Dadi HK et al, 2003; De Saint-Basile G et al, 2004) asociada con una inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y una mortalidad temprana, anterior a los 3 años. Sin embargo, no sucede así en el caso de CD3 $\gamma$  que permite una cierta selección y desde luego la expansión periférica de linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  (Pacheco-Castro A et al, 1998; Recio MJ et al, 2007; Siegers GM et al, 2007) (Figura 9), aunque con una estequiometría aberrante ( $\alpha\beta/\delta\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ ) y mala asociación del homodímero  $\zeta\zeta$  (Zapata DA et al, 1999 y 2004; Figura 5).



**Figura 14. Bloqueo parcial (.....) o completo (—) de la diferenciación temprana de las células T causada por la ausencia de las cadenas invariantes del complejo TCR en humanos y ratón.** El desarrollo de las células T se divide en dos etapas: A) La transición de DN (dobles negativas CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) a DP (dobles positivas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). B) La transición de DP a SP (simples positivas, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>).



Los únicos casos descritos para deficiencia humana de CD3 $\gamma$  hasta 1996 son los descritos por nuestro laboratorio (Regueiro JR et al, 1986; Arnáiz-Villena A et al, 1992). A partir del año 1996, se describieron dos nuevos casos, también deficientes para CD3 $\gamma$  (Tabla III).

La edad de manifestación clínica de los síntomas en estos pacientes ocurre durante la infancia (antes de los tres años de edad) y aparecen como infecciones respiratorias (virales y bacterianas en todos los pacientes) y otitis. Las bacterias aisladas se han identificado como *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enteritidis* y *Yersinia enterocolitica*, y los virus identificados fueron Adenovirus, Citomegalovirus, Parainfluenza y EBV (Virus de Epstein-Barr). Además, los hallazgos clínicos muestran la presencia de candidiasis y aspergilosis. Otros síntomas observados son diarrea crónica, fallos en la deglución, enteropatías autoinmunes, fallos respiratorios, bronquitis asmática, rinitis alérgica, eczema atópico, vitiligo, meningitis vírica con infiltrado linfocitario y cardiomiopatía dilatada. Finalmente también se observaron infecciones del tracto urinario y sinusitis crónica (Véase Tabla II).

**Tabla II.- Resumen de los datos clínicos y diagnósticos de los pacientes de CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup>**

	Turquía	España
	Familia 1	Familia 2
Paciente	IV:4	III.2
Diagnóstico (m) <sup>1</sup>	48	48
Edad actual	20a	30a
Autoinmunidad	psoriasis; título microsomal y de autoanticuerpos tiroglobulina bajos en el momento del diagnóstico.	vitiligo; títulos de tiroglobulina y de autoanticuerpos peroxidasa tiroidea bajos después de los 17a de edad.
Infecciones	Infecciones del tracto urinario	linfocitarias – probablemente meningitis viral
Otros datos clínicos	Bronquitis asmática; hiperreactividad bronquial no-atópica; sinusitis maxilar	otitis; bronquitis asmática; rinitis alérgica; eczema atópico

1- m (meses); a (años). Edad actual en 2011.

Los hallazgos de laboratorio mostraron que el número total de linfocitos es normal o ligeramente disminuido en sangre venosa, pero existen alteraciones en las proporciones de las diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, como por ejemplo, la ausencia total de células T (tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>) en pacientes deficientes en CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$  (Dadi HK et al, 2003; De Saint Basile G et al, 2004). Desde el punto de vista funcional, se observó una reducción en la respuesta proliferativa a determinados mitógenos de los linfocitos T mutantes, incluida la respuesta frente a anticuerpos anti-CD3 en todos los pacientes con

inmunodeficiencia de CD3 $\gamma$  (Españoses y Turco). Además, se observó una respuesta deficiente a ciertos polisacáridos y a la respuesta mediada por IgG2, ambas dependientes de células B, que a su vez dependen, para su correcta activación, de linfocitos T.

La capacidad de exportación de linfocitos T maduros desde el timo fue evaluada en individuos deficientes en CD3 $\gamma$  en los que se analizaron el número de células CD45RA<sup>+</sup>, el repertorio del TCR $\nu\beta$  y la cuantificación y monitorización del “*output*” tímico mediante TRECs (*T cell receptor excision circles*) a partir de PBMC (Células mononucleares de sangre periférica). Los resultados obtenidos en los pacientes indican un número reducido de linfocitos T (CD45RA<sup>+</sup> TREC<sup>+</sup>) (**Recio MJ et al, 2007**) en comparación con los individuos control, lo que sugiere un aporte deficitario desde el timo (**Mackall CL et al, 1993**) o una supervivencia muy baja al poseer débiles interacciones homeostáticas TCR/MHC (**Freitas AA et al, 2000**). Sin embargo, el número de linfocitos T y el repertorio TCR $\nu\beta$  de las células memoria (CD45RO<sup>+</sup>) es normal. Esto nos indica que la ausencia de CD3 $\gamma$  conlleva a un defecto en la producción tímica, pero no en la expansión periférica o acumulación de células T maduras policlonales (**Recio MJ et al, 2007**).

Estudios previos realizados con células T humanas deficientes en CD3 $\gamma$  dependientes de IL-2 y transformadas con el virus *Herpesvirus saimiri* (HVS) indican que CD3 $\gamma$  contribuye, pero no es absolutamente necesario, a la regulación del tráfico del receptor en células T en reposo y en células T activadas por ligando (**Torres PS et al, 2003**). A pesar de estos efectos en la expresión del receptor (reciclaje del complejo afectado), CD3 $\gamma$  no es imprescindible para diversas respuestas en linfocitos T maduros como el flujo de calcio, la citotoxicidad, la regulación de moléculas de superficie, la proliferación y la síntesis de citoquinas (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ). Por el contrario, la internalización del complejo mediada por PMA, la inducción de la síntesis de otras citoquinas como la IL-2 a través del complejo TCR/CD3, la adhesión y la polarización se encuentran afectadas en células T humanas deficientes en CD3 $\gamma$  (**Perez-Aciego P et al, 1991; Arnaiz-Villena A et al, 1992; Pacheco-Castro A et al, 1998; Torres PS et al, 2002**).

La deficiencia de CD3 $\gamma$  en ratón, a diferencia de humanos, se caracteriza por presentar un bloqueo severo en el desarrollo del compartimiento T (**Haks MC et al, 1998**). Los timocitos encontrados en el timo son DN, lo cual sugiere un bloqueo temprano en el desarrollo linfoide durante la transición de DN a DP. Comparativamente con la

inmunodeficiencia de CD3 $\gamma$  en humanos, a estos ratones no se les ha detectado linfocitos T maduros circulantes (en sangre periférica), aunque sí en sus órganos linfoides periféricos (**Haks MC et al, 1998**). Esta observación sugiere que el complejo pre-TCR ensamblado por estas células, aunque deficiente, permite cierto grado de selección y desarrollo de células pre-T. Es posible que esta observación indique la existencia de algún tipo de proceso de maduración pre-TCR independiente.

Las deficiencias humanas en CD3 $\delta$  y CD3 $\epsilon$  se caracterizan por una linfopenia selectiva del linaje T y con un grave defecto de expresión del complejo TCR/CD3 (**Tabla III**). En ambos tipos de inmunodeficiencia hay una ausencia total de linfocitos maduros T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  en periferia, mientras que el número de células NK (*Natural Killer*) y células B es prácticamente normal. Por tanto, el fenotipo de este tipo de inmunodeficiencias SCID sería el siguiente: T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> (**Dadi HK et al, 2003; De Saint-Basile G et al, 2004**). Comparativamente con el modelo de ratón descrito para la deficiencia de CD3 $\delta$  (**Dave VP et al, 1997**), la selección tímica se encuentra bloqueada en la transición de DP (Dobles Positivos) a SP (Simple Positivos) en los linfocitos T $\alpha\beta$  (**Figura 14**) mientras que la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$  procedentes de DN (Dobles Negativas) no se encuentra afectada, a diferencia de humanos (**Dave VP et al, 1997**), sugiriendo que la cadena deficiente no es indispensable para la señalización a través de pre-TCR. Por tanto, el desarrollo tímico de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$  en ratón no requiere de CD3 $\delta$  aunque sí para el desarrollo completo de los linfocitos T $\alpha\beta$ . Este hecho se encuentra en línea con la estequiometría observada en el receptor de los linfocitos T $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta/\gamma\epsilon\gamma\epsilon\zeta\zeta$ ) que no incorpora CD3 $\delta$  a diferencia de los humanos (**Hayes SM et al, 2006; Siegers GM et al, 2007**).

El modelo de ratón descrito para la deficiencia de CD3 $\epsilon$  (**Le Deist F et al, 1991**) presenta un bloqueo total en DN3 (Dobles Negativas estadio 3), indicando una ausencia total de señal en el pre-TCR (**Malissen B et al, 1995; Sommers CL et al, 2000**) y un bloqueo total en el desarrollo de linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$ . Por tanto, este modelo presenta una gran similitud, en cuanto al bloqueo en el desarrollo de linfocitos, con la inmunodeficiencia de CD3 $\epsilon$  humana (**Figura 14**).

Por último, los estudios realizados en ratones deficientes en la cadena TCR $\beta$  han puesto de manifiesto la necesidad de esta cadena para la transición de DN a DP con un bloqueo en el

estadio DN3 (**Mombaerts P et al, 1992**). La etapa DN3 es crítica puesto que marca la transición entre los TCR independientes y los TCR dependientes, es decir que si los genes reordenados del TCR no producen una cadena TCR $\beta$ , o en su defecto las cadenas TCR $\gamma$  o TCR $\delta$ , las células no sobrevivirán. De forma análoga, sucede un bloqueo similar en los ratones deficientes en la cadena pre-TCR $\alpha$  o RAG $^{-/-}$ . Finalmente, se ha observado que en estos ratones deficientes en las cadenas TCR, existe una pequeña subpoblación que se desarrolla hacia DP, sugiriendo que otras cadenas son capaces de reemplazar las cadenas TCR $\beta$  o TCR $\alpha$  ausentes (**Buer J et al, 1997**).

### 3.2. Deficiencias parciales.

La deficiencia parcial de CD3 $\zeta$  en humanos se presenta como una inmunodeficiencia combinada severa (SCID) con fenotipo T $^{+/-}$ B $^{+}$ NK $^{+}$  caracterizado por un número reducido de linfocitos T $\alpha\beta$  con una disminuida expresión del complejo TCR/CD3 (**Roberts JL et al, 2007**) (**Tabla III**). Dicha deficiencia de TCR $\zeta$  se caracteriza por un bloqueo parcial en el desarrollo de las células T durante la transición de DP a SP (**Figura 14**), y es comparable con el modelo de ratón deficiente en CD3 $\zeta$ , debido a que estos últimos presentan un número reducido de linfocitos T $\alpha\beta$  (**Love PE et al, 1993; Malissen B et al, 1993**), aunque el bloqueo parcial en el desarrollo de células T en ratones ocurre durante la transición de DN a DP y de DP a SP (**Figura 14**). Por otra parte, no se ha analizado en humano ni ratón, el bloqueo en el desarrollo de linfocitos T $\gamma\delta$  en esta deficiencia.

Otra deficiencia parcial descrita en humanos es la de CD3 $\epsilon$  caracterizada por una expresión residual (aproximadamente el 10%) del complejo TCR/CD3 en linfocitos T $\alpha\beta$  (**Le Deist F et al, 1991**).

Estudios recientes han descrito una nueva inmunodeficiencia autosómica recesiva en dos pacientes no relacionados con una mutación en homocigosis G>A en el exón 3 del cromosoma 14 caracterizada con susceptibilidad a infecciones, autoinmunidad y una severa reducción de la expresión del complejo TCR (**Morgan NV et al, 2011**). La mutación afecta a la región constante de la subunidad TCR $\alpha$  y a nivel de proteína conlleva la pérdida de la región de unión al péptido conector afectando a los dominios transmembrana e intracitoplasmático (Véase **Tabla III**). Asimismo, en nuestro laboratorio se ha descrito otra nueva inmunodeficiencia para CD3 $\delta$  en dos pacientes no relacionados con un bloqueo

selectivo para células T $\alpha\beta$  pero no  $\gamma\delta$ , asociada a una nueva mutación en *splicing* para el gen *CD3D* (Gil J et al, 2011). Ambos pacientes muestran una severa reducción de la expresión del complejo TCR y las subpoblaciones B y NK normales (**Tabla III**).

Por último, hemos analizado en nuestro laboratorio individuos portadores de cierta mutación en una zona muy conservada de la región transmembranal de CD3 $\gamma$  (p.V131F) un defecto fenotípico de expresión comparable al de los heterocigotos de CD3 $\gamma$ . Aunque la mutación es frecuente en sanos, algunos eran pacientes con infecciones, y uno de ellos homocigoto para la mutación falleció con una clara inmunodeficiencia.

Deficiencia	CD3δ																		
Familia	1			2	3	4			5			6	7			8	9		
Nacionalidad	Menonitas (Cánada, USA, Alemania)									Francia			Japón			Ecuador			
Paciente/sexo	1F	2M	3M	4F	5M	6F	7M	8F	9M	10F	11F	12F	13M	14F	15M	16M	17M	18M	
Consanguíneo	Si													No	Si		No		
Mutación (leaky) <sup>7</sup>	Proteína truncada													Skip3			Skip2		
Diagnóstico a (m) <sup>1</sup>	0	2	2	9	0	0	0	10	13	0	3	0	2	3	0	0	14	4	
% células CD3 <sup>+</sup> <sup>2</sup>	0.3	0.1	0.6	2	0	0	1	0	27	1	<1		0	1.7	0.2	0	14	30	
TMO <sup>3</sup>	DM	No	No	DM	DM	ID	H	H	H	H	No	H	H	H	SC	SC	ID	H	
Edad actual <sup>1</sup>	10a	†2m	†3m	18a	3a	1a	†20	†12	†2a	17a	†5m	†6m	†6m	†3m	5a	1a	4a	†5m	
Causa de defunción <sup>4</sup>	VS	ADV	CMV	VS	VS	VS	GvHD	HHV6	CMV	VS	CMV	Asp	EBV	CMV	VS	VS	VS	CMV	
Referencias	1			2						3			4		5	6			

Deficiencia	CD3γ					CD3ε				CD247		TCRα	
Familia	1		2	3		1	2			1	2	1	2
Nacionalidad	Turquía			España		Francia				El Caribe	Hawai	Pakistán	
Paciente/sexo	1M	2M	3M	4M	5M	1M	2F	3M	4F	1M	2F	1F	2M
Consanguíneo	Si			No		No	Si			ND <sup>5</sup>	No	Si	
Mutación (leaky) <sup>7</sup>	Trunc			Trunc, Het		Skip7, Trunc, Het	Trunc			Trunc	Inserción	Skip3	
Diagnóstico a (m) <sup>1</sup>	3	7	48	12	48	48	5	1	0	4	10	15	6
% células CD3 <sup>+</sup> <sup>2,6</sup>	37	27	30	10	18	63	ND	ND	<1	21	64	21	50
TMO <sup>3</sup>	No	ID	No	No	No	No	No	No	H	H	H	H	H
Edad actual <sup>1</sup>	†9m	†20m	20a	†32m	30a	22a	†5m	†3m	†2m	10a	12 <sup>a</sup>	?	?
Causa de defunción <sup>4</sup>	Sepsis	Neum	VS	CMV	VS	VS	Neum	CMV	ADV	VS	VS	VS	VS
Referencias	7		8	9		10	11			12	13	14	

**Tabla III. Deficiencias del complejo TCR. Datos clínicos e inmunológicos.**

1- m (mes); a (años). Edad actual en 2011; † (exitus at)

2- En el diagnóstico, valores normales 60-85%, incluye células CD3 *dull* y *bright*.

3- H (Haploidentico); ID (HLA-matched relative); DM (donante desconocido de médula ósea); SC (sangre de cordón umbilical).

4- VS (vivo y sano); ADV, CMV, EBV, HHV (infección viral); Neum (Neumonía); Asp (Aspergillus); GvHD (enfermedad injerto contra huésped).

5- ND (no descrito).

6- Para defectos en TCRα principalmente células TCRγδ<sup>+</sup>, pocas células TCRαβ<sup>low</sup>.

7- Leaky se refiere a los niveles de proteína normal. Skip7 (deleción del exón 7), Trunc (proteína truncada), Het (heterocigoto compuesto).

Referencias: (1) Dadi HK et al 2003 (2) De Saint Basile G et al 2004 (3) Roifman CM 2004 (4-5) Takada H et al 2005 (6) Gil J et al 2011 (7) Recio MJ et al 2007 (8) Sanal OZ et al 1996 (9) Arnáiz-Villena A et al 1992 (10) Soudais C et al 1993 (11) De Saint Basile G et al 2004 (12) Rieux-Laucat F et al 2006 (13) Roberts JL et al 2007 (14) Morgan NV et al 2011



## 4. Linfocitos transformados con *Herpesvirus saimiri* (HVS)

En el estudio de las inmunodeficiencias de los linfocitos T, una de las principales limitaciones es la baja disponibilidad de células para llevar a cabo los diferentes ensayos. Hasta el momento, en todos los estudios se empleaban directamente los linfocitos T primarios procedentes del paciente o bien se generaban líneas de linfocitos T dependientes de IL-2. En otras ocasiones también se han empleado re-estimulaciones con células alogénicas. En cualquier caso, todos estos enfoques se encuentran limitados por la vida media finita de estas líneas celulares. Por consiguiente, la immortalización de líneas mediante el empleo de virus linfotróficos convierte este sistema en una valiosa herramienta de trabajo que nos permite estudiar con más detenimiento las inmunodeficiencias, en nuestro caso la deficiencia de CD3 $\gamma$ .

Previamente, se ha descrito un sistema de immortalización de linfocitos T *in vitro* a partir de la transformación de líneas con el virus *Herpesvirus saimiri* (HVS) (Meinl E et al, 1995). Este virus se clasifica como un rhadinovirus ( $\gamma^2$ - herpesvirus) y se caracteriza por ser un virus T linfotrófico que se establece y replica persistentemente en diferentes hospedadores de primates. Sin embargo, dentro del subgrupo C de este tipo de virus, la cepa C488 es capaz de transformar linfocitos T humanos *in vitro* (Biesinger B et al, 1992). De este modo, las líneas celulares transformadas presentan un crecimiento indefinido y estable, teniendo el virus un alto número de copias de forma estable, sin integrarse en el genoma del hospedador, como un episoma (Biesinger B et al, 1992; Fickenscher H et al, 1997). Los linfocitos T infectados por el virus no liberan partículas virales y se caracterizan por presentar una morfología linfoblastoide típica de blastos T (Biesinger B et al, 1992; Fickenscher H et al, 1996, 1997). El crecimiento óptimo de las líneas immortalizadas con HVS requiere una elevada densidad celular y la adición exógena de IL-2 (Mittrücker HW et al, 1992), sin embargo, a diferencia de las células primarias, no responden a la estimulación mediada por antígenos o mitógenos. Estas líneas transformadas se caracterizan por preservar el fenotipo parental de los linfocitos T (Bröker BM et al, 1993; De Carli M et al, 1993; Weber F et al, 1993; Yasukawa M et al, 1995; Pacheco-Castro A et al, 1998; Fickenscher H et al, 1997).

En el subgrupo C del virus HVS, se han descrito dos marcos abiertos de lectura (ORF; *open reading frames*) donde se localizan dos proteínas relacionadas con la transformación celular en linfocitos T. La primera proteína es stpC (*saimiri transformation-associated protein of subgroup C strains*) y la segunda proteína es Tip (*tyrosine kinase interacting protein*)



(Biesinger B et al, 1990, 1995; Knappe A et al, 1997; Duboise SM et al, 1998). Se asocia a la primera proteína –stpC– una función adaptadora que no ha sido esclarecida totalmente. En cuanto a la segunda proteína -Tip-, se asocia a la proteína-tirosina-quinasa Lck, relacionada con la señalización intracelular (Wiese N et al, 1996; Fickenscher H et al, 1997).

La immortalización de linfocitos T también ha sido llevada a cabo por otros sistemas virales, empleando por ejemplo el virus HTLV-I (*Human T-cell Leukemia Virus-I*). En este caso, el virus HTLV-I es un retrovirus, de modo que es capaz de integrarse en el genoma del hospedador. Pese a su capacidad de transformación, presenta una serie de limitaciones: en primer lugar, sólo es capaz de transformar linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (Inatsuki A et al, 1989; Yssel H et al, 1989); en segundo lugar, tras la immortalización el virus establece dos fases de infección, la primera independiente de IL-2 de modo que pierde la expresión del receptor clonotípico de esta citoquina (CD25), lo cual limita los estudios funcionales. En la siguiente fase, se produce la pérdida de expresión de un mayor número de receptores de membrana (Yssel H et al, 1989), lo cual invalida la immortalización por el virus HTLV-I como modelo de estudio *in vitro*.

#### 4.1. Fenotipo.

Las líneas celulares transformadas con HVS preservan el fenotipo de las líneas parentales (Bröker BM et al, 1993; De Carli M et al, 1993; Fickenscher H et al, 1997; Pacheco-Castro A et al, 1998; Weber F et al, 1993; Yasukawa M et al, 1995). El fenotipo es característico de un linfocito T $\alpha\beta$  maduro, expresando marcadores CD3<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD11a/CD18<sup>+</sup> (LFA-1), CD54<sup>+</sup> (ICAM-1), CD58<sup>+</sup> (LFA-3) (Biesinger B et al, 1992; Weber F et al, 1993; Meinel E et al, 1995; Fickenscher H et al, 2001). En nuestro caso, el estudio de la inmunodeficiencia de CD3 $\gamma$  preserva los defectos de expresión del complejo TCR/CD3 (Figura 15) excepto en el estudio de precursores intra-tímicos CD34<sup>+</sup>, en los cuales se preservan fenotipos inmaduros CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Pacheco-Castro A et al, 1998). Además, las líneas transformadas expresan marcadores de activación como CD25<sup>+</sup> (IL-2R $\alpha$ ), CD69<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD154<sup>+</sup> (Weber F et al, 1993).

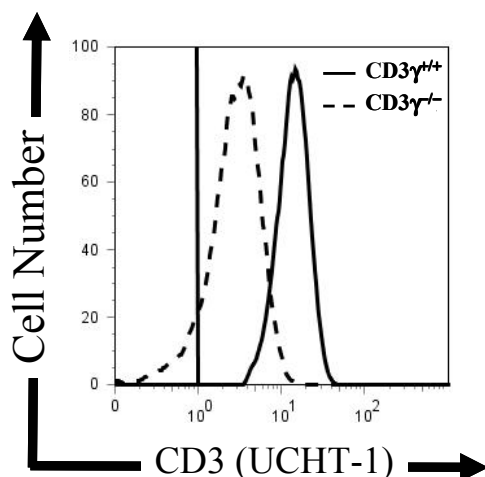


Figura 15. Expresión comparativa de CD3 (clon entre paréntesis) entre linfocitos T deficientes (línea discontinua) y control (línea continua) transformados con HVS.

Desde el punto de vista funcional, las líneas transformadas con HVS preservan la transmisión de señales intracelular a través del complejo TCR/CD3 (Torres PS et al, 2002) desde eventos proximales, como la fosforilación de proteínas, y la inducción de marcadores de activación, hasta eventos funcionales efectores como la citotoxicidad, la respuesta proliferativa y la apoptosis (Mittrücker HW et al, 1993; De Carli M et al, 1993). Pese a ello, el modelo presenta algunos inconvenientes, en primer lugar las líneas transformadas pierden la expresión de CD28 en membrana, pero expresan otras moléculas como CD66 – expresada en granulocitos –, que no se observan en los linfocitos T humanos de sangre periférica (Wiese N et al, 1996; Fickenscher H et al, 1997). En segundo lugar, la interacción de la proteína de transformación Tip se encuentra involucrada en una activación constitutiva de las proteína-tirosina-quinasa ( $p56^{Lck}$ ).

#### 4.2. Aplicaciones al estudio de las inmunodeficiencias.

El empleo de las líneas transformadas con el virus HVS, como modelo *in vitro*, ha permitido la caracterización fenotípica y funcional de diferentes inmunodeficiencias primarias y secundarias de linfocitos T. En concreto, este modelo ha sido empleado para el estudio de la inmunodeficiencia CD3 $\gamma$  (Rodríguez-Gallego C et al, 1996), el estudio de la inmunodeficiencia de MHC-II (Alvarez-Zapata D et al, 1998; Matheux F et al, 2002), el estudio de la inmunodeficiencia común variable (CVID) (Cabanillas JA et al, 2002), el estudio de la ataxia-telangiectasia (Rivero-Carmena M et al, 2000; Perfettini JL et al 2008), el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS)(Gallego MD et al, 1997), y en el caso de inmunodeficiencias secundarias, el estudio del virus del sida VIH. En todos los casos estudiados las líneas inmortalizadas preservan el fenotipo de las líneas parentales descrito en linfocitos T primarios.

## **1. Papel biológico de la cadena CD3 $\gamma$ en la señalización del linfocito T maduro.**

El complejo TCR/CD3 señala mediante oligomerización y cambios conformacionales que le permiten reclutar en el citosol a quinasas y proteínas adaptadoras. La participación y el papel biológico de cada una de las cadenas CD3 en la señalización intracelular sigue siendo un tema de discusión. Con objeto de acotar la contribución y las conexiones de la cadena CD3 $\gamma$  en la señalización del complejo TCR/CD3, nos hemos propuesto estudiar eventos de señalización tempranos (fosforilación de sustratos) y tardíos (reorganización de la F-actina, la expansión de las células iNKT en respuesta a  $\alpha$ -galactosil-ceramida) en linfocitos T primarios o transformados.

## **2. Diferencias fenotípicas y funcionales entre la falta congénita (mutantes naturales) y adquirida (*Knock-Down*) de CD3 $\gamma$ o CD3 $\delta$ en linfocitos T maduros.**

En humanos la falta congénita de las cadenas CD3 causa un grupo de inmunodeficiencias caracterizadas por una severa linfopenia selectiva del linaje T, asociada a un grave defecto de expresión del complejo TCR/CD3, que en el caso de CD3 $\gamma$  pero no de CD3 $\delta$ , permite cierto grado de selección y expansión periférica de los linfocitos T. Por tanto es difícil abordar el papel biológico de CD3 $\delta$  en linfocitos T maduros. A pesar del elevado grado de homología que comparten ambas cadenas CD3 ( $\gamma$  y  $\delta$ ), sólo CD3 $\delta$  muestra una función no redundante en el comienzo del desarrollo de células T en humanos, como lo demuestra el hallazgo de que la ausencia de CD3 $\delta$ , pero no CD3 $\gamma$ , carece completamente de linfocitos T en sangre periférica. Sin embargo, se desconoce si la contribución de la cadena CD3 $\delta$  en el desarrollo de los linfocitos T es funcional o estructural. Con objeto de abordar el papel de CD3 $\delta$  en linfocitos T maduros nos hemos propuesto analizar el efecto de su deficiencia adquirida mediante interferencia (*Knock-Down*) en linfocitos T maduros en comparación con la de CD3 $\gamma$  y con los mutantes naturales de CD3 $\gamma$ .

## 1. Material biológico.

### 1.1. Humano.

Este trabajo ha sido realizado con células procedentes de dos pacientes: DSF (III.2; c.1A>G; c.IVS2-1G>C) y FK (IV.4; c.205A>T) ambos diagnosticados de una deficiencia congénita de expresión de la proteína CD3 $\gamma$ . Son los dos casos existentes en todo el mundo para la deficiencia de CD3 $\gamma$  y pese a tener diferentes mutaciones presentan idéntico inmunofenotipo. Sus historias clínicas y sus características inmunológicas han sido descritas previamente de forma amplia (véase introducción). Los ensayos presentados en esta tesis se efectuaron en linfocitos T $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> transformadas con HVS y en linfocitos primarios (iNKT) carentes de CD3 $\gamma$ . El crecimiento de las líneas transformadas HVS ha sido realizado en paralelo, en un medio de crecimiento completo RPMI 1640 (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) y Panserin (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) en relación 1: 1 con un 10% de FCS (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), 1% L-Glutamina (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK), 1% Antibiótico (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) y 100 IU/ml human rIL-2 (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ, USA) en 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

Las células iNKT fueron obtenidas a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL) procedentes de un individuo deficiente en CD3 $\gamma$  (DSF) y de controles sanos. Posteriormente fueron estimuladas en presencia de 100ng/ml de  $\alpha$ -GalCer (Kirin) y 50IU/mL de rhIL-2 durante 11 días. La caracterización de las células iNKT se realizó con el empleo de anticuerpos anti-TCRV $\alpha$ 24 y anti-TCRV $\beta$ 11 (Coulter Immunotech) mediante citometría de flujo.

En los estudios de *Knock-Down* (KD) se han empleado líneas celulares T $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> (*Jurkat wild type*, E6-1, *American Type Culture Collection*). El medio de crecimiento completo empleado en estas líneas es RPMI 1640 (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) con un 10% de FCS (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA), 1% L-Glutamina (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) y 1% Antibiótico (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) en 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

## 2. Fenotipo.

### 2.1 Tinción extracelular.

Para la tinción extracelular, se emplearon  $20 \times 10^4$ - $30 \times 10^4$  células procedentes de los cultivos, lavadas en PBS 1X, dejándolas en un volumen final de 100 $\mu$ L, al que se añadió la concentración adecuada correspondiente a cada anticuerpo o antisuero (véase apartado 2.3.). Se incubaron durante 15 minutos a 4 ° C. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X, y se resuspendieron en 200 $\mu$ L de PBS 1X en el caso en que el anticuerpo estuviese conjugado directamente (marcaje directo). En caso contrario (marcaje indirecto), las células se resuspendieron en 100 $\mu$ L de PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario de ratón (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) o de conejo (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluido 1/100. Tras una incubación de 15 minutos a 4° C y en oscuridad, las células se resuspendieron en PBS 1X después de varios lavados. Tanto en el marcaje directo como indirecto, se procedió al análisis de las células marcadas mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickison).

### 2.2. Tinción intracelular.

Para la tinción intracelular, se emplearon  $1 \times 10^6$  células procedentes de los cultivos, y se lavaron en PBS 1X dejándolas en un volumen final de 100 $\mu$ L de PBS 1X-PF2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron permeabilizadas con PBS 1X-0.05% Saponina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), y se incubaron con las concentraciones adecuadas para los anticuerpos o antisueros empleados (véase **Tabla IV**) durante 15 minutos a 4° C. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X, y resuspendieron en 200 $\mu$ L de PBS 1X en el caso en que el anticuerpo estuviese conjugado directamente (marcaje directo). En caso contrario (marcaje indirecto), las células se resuspendieron en 100 $\mu$ L de PBS y se incubaron durante 15 minutos a 4° C y en oscuridad con un anticuerpo secundario de ratón (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) o de conejo (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluido 1/100. Las células se resuspendieron en PBS 1X después de varios lavados. Tanto en el marcaje directo como indirecto, se procedió al análisis de las células marcadas mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickison).

### 2.3. Anticuerpos utilizados.

Los anticuerpos y antisueros específicos empleados en el desarrollo de esta tesis se encuentran recogidos en las siguientes tablas:

Reactividad	Clon	Isotipo/Origen	Uso	Fuente
CD3	Leu4/SK7	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
	OKT3	IgG <sub>2a</sub> / Ratón	TE/A	Dr. Bent Rubin
	MEM-57	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Monosan <sup>TM</sup>
	RW28C8	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Dr. Ellis Reinherz
	F101.01	IgG <sub>2a</sub> / Ratón	TE	Dr. Bent Rubin
	UCHT-1	IgG <sub>2a</sub> / Ratón	TE/A	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
	S4.1	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
	CRIS 7	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Dr. Vilella
	TG5	Anti-suero (CD3 $\gamma$ )	TI/IP	Dr. Alexander
	SP-34	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE/TI	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
CD247/TCR $\zeta$	6B10.2	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE/TI	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
TCR $\alpha\beta$	BMA031	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
TCR $\gamma\delta$	INMU510	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
TCR $\epsilon\beta$ 1	JOVI-1	IgG <sub>2a</sub> / Ratón	TE	Dr. Balbino Alarcón
TCR $\nu\beta$ 3	CH92	IgM / Ratón	TE	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
TCR $\beta$	$\beta$ F1	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE/TI	Endogen <sup>TM</sup>
TCR $\nu\beta$ 8	V $\beta$ 8	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
CD4	13B8.4	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE/TI	Coulter Immunotech <sup>TM</sup>
	Leu- 3a	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE/TI	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
CD8	B9.11	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
CD25	UCHL-1	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>
CD69	Leu-23	IgG <sub>1</sub> / Ratón	TE	Becton Dickinson (BD) <sup>TM</sup>

Reactividad	Origen	Uso	Fuente
Anti-mouse Ig G (H+L) – PE/FITC	Cabra	TE/TI	Caltag Laboratories <sup>TM</sup>
Anti-mouse Ig G (H+L) – HRP	Cabra	WB/IP	Amersham Biosciences <sup>TM</sup>
Anti-rabbit Ig G (H+L) – PE/FITC	Cabra	TE/TI	Caltag Laboratories <sup>TM</sup>
Anti-rabbit Ig G (H+L) – HRP	Cabra	WB/IP	Sigma Chemical Co <sup>TM</sup>
Control de isotipo Ig G	Cabra	TE/TI	Immunostep <sup>TM</sup>
Control de isotipo Ig G + Ig M	Cabra	TE/TI	Immunostep <sup>TM</sup>
Suero irrelevante MR1	Conejo	TE/TI	Dr. Eduardo Martínez-Naves

**Tabla IV-V. Listado de anticuerpos primarios (arriba) y secundarios (abajo) empleados durante el desarrollo de esta tesis.** (TE, Tinción extracelular; TI, Tinción intracelular; IP, Inmunoprecipitación y WB, western-blot).

	Reactividad	Clon	Isotipo/Origen	Uso	Fuente
Señalización intracelular	Phospho-ZAP70	Tyr319/Tyr352	IgG <sub>1</sub> / Conejo	TI/WB	Cell Signaling™
	Phospho-VAV	Tyr174	IgG <sub>1</sub> / Conejo	WB	Dr. Xosé Bustelo
	Phospho-ERK	E4	IgG <sub>2a</sub> / Ratón	WB	Santa Cruz Biotechnology™
		Thr202/Tyr204	IgG <sub>1</sub> / Conejo	TI/WB	Cell Signaling™
	Phospho-JNK	G7	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Santa Cruz Biotechnology™
	Phospho-p38	Thr180/Tyr182	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Cell Signaling™
	Phospho-Tirosina	4G10	IgG <sub>2b</sub> / Ratón	IP/WB	Upstate™
	mTORC2	Ser2481	Policlonal/Conejo	WB	Cell Signaling™
	ERK total	3A7	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Cell Signaling™
	VAV total	E4	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Santa Cruz Biotechnology™
	LAT total	2E9	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Upstate™
	mTOR	L27D4	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Cell Signaling™
	α-Tubulina	B5.1.2.	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Sigma Chemical Co™
CD3	CD3ε	M-20	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Santa Cruz Biotechnology™
	CD3δ	APA1/2	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Dr. Alexander
	TCRζ	6B10.2	IgG <sub>1</sub> / Ratón	WB	Santa Cruz Biotechnology™

**Tabla VI. Listado de anticuerpos empleados en el análisis bioquímico de la señalización intracelular del complejo TCR/CD3 y los estudios de Knock-down desarrollados en esta tesis.** (TI, Tinción intracelular; IP, Inmunoprecipitación y WB, western-blot).

### 3. Función.

#### 3.1. Internalización del TCR/CD3.

La internalización del complejo TCR/CD3 inducida por esteres de forbol (PMA) se realizó en ensayos de dosis-respuesta y de cinética según el protocolo previamente descrito (Torres PS et al, 2003). Las células a analizar se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en medio estéril completo a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos a 37° C en presencia y ausencia de PMA (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 20ng/ml. En los ensayos de dosis-respuesta, las células se estimularon durante 30 minutos a concentraciones crecientes de PMA (20, 40, 80 y 160 ng/ml). En los ensayos de cinética, las células se incubaron con PMA a 20ng/ml durante 30, 60, 90 y 120 minutos. Concluida la estimulación, las células tratadas y sin tratar son lavadas en PBS 1X y analizadas mediante citometría de flujo con el anticuerpo anti-CD3 correspondiente.

De modo análogo al apartado anterior, se analizó la internalización del complejo TCR/CD3 en respuesta a anticuerpos anti-CD3. Para ello los linfocitos se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en medio estéril completo a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 37° C en presencia y ausencia de un anticuerpo anti-CD3 a una concentración de 10µg/ml. Concluida la estimulación, las células tratadas y sin tratar fueron lavadas en PBS 1X y analizadas mediante citometría de flujo con el anticuerpo anti-CD3 correspondiente.

#### 3.2. Inducción del flujo de $\text{Ca}^{2+}$ .

Los ensayos para determinar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta anti-CD3 (OKT3 ó UCHT-1) se realizaron en células T HVS y linfocitos T Jurkat, siguiendo el protocolo descrito previamente por (Torres PS et al, 2003). Brevemente, las células se lavaron en medio HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK) a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en un volumen de 500µL en presencia de un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fluo3AM; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 10µM durante 45 minutos a 37° C en un baño con agitación. Concluida la incubación con el quelante, las células se resuspendieron en medio HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  a temperatura ambiente a una concentración de  $50 \times 10^4$  células/ml. Los cambios en la intensidad de la fluorescencia son recogidos en función del tiempo (segundos) según la siguiente secuencia: 1) Fluorescencia basal de células cargadas con el Fluo3AM empleada como control negativo y valor de referencia de la técnica; 2) Respuesta anti-CD3



(OKT3) a 10µg/ml; 3) Se añade el anticuerpo secundario anti-IgG a una concentración de 40µg/ml; 4) Por último se añade la ionomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) empleada como control positivo de máxima liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados son representados como variación de la intensidad de fluorescencia verde (Fluo3AM) en función del tiempo (segundos).

### **3.3. Proliferación celular.**

El CFSE (diacetato de carboxifluoresceína ester succinimidil) es un compuesto fluorescente que se usa para evaluar la proliferación de los linfocitos T, tanto *in vitro* como *in vivo*, gracias a la capacidad que tiene para reducir a la mitad su fluorescencia con cada división celular (Lyons AB, 2000). La única limitación que presenta es su toxicidad a altas concentraciones. Mediante el uso de anticuerpos dirigidos frente a marcadores de superficie, es posible analizar el comportamiento de las diferentes poblaciones linfocitarias.

Los linfocitos aislados de sangre periférica se lavaron dos veces con PBS y se dejaron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS con CFSE (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 1µM. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37° C y en agitación. A continuación la reacción se paró añadiendo PBS frío y posterior incubación durante 5 minutos en hielo. Posteriormente se realizaron dos lavados por centrifugación en PBS frío a 4° C. Finalmente las células se estimularon con un anticuerpo anti-CD3 (UCHT1) pegado a plástico durante 5 días a 37° C.

### **3.4. Inducción de CD69.**

Para realizar los ensayos de inducción, las células se mantuvieron en medio RPMI completo, sin FCS ni IL-2, durante la noche anterior al experimento. Posteriormente, fueron dispensadas a una concentración de  $50 \times 10^4$  células/ml en un volumen de 200µL, en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células fueron cultivadas en presencia y ausencia de anticuerpo anti-CD3 (OKT3) previamente inmovilizado en placa, a una concentración de 10µg/ml o bien con PMA (10ng/ml) con Ionomicina (750ng/ml) durante 24 horas a 5% de  $\text{CO}_2$  y 37° C. Concluida la activación, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X (centrifugación en placa a 1600 r.p.m. 5 minutos) y luego se realizó la tinción extracelular como se ha descrito previamente (véase apartado 2.1) con los anticuerpos correspondientes a las proteínas inducidas (véase tabla VI). Finalmente, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo.

### 3.5. Fosforilación de proteínas.

Los ensayos de fosforilación en respuesta a moAb anti-CD3 (UCHT-1) se realizaron en células T HVS CD4<sup>+</sup>  $\gamma^{+/+}$  y  $\gamma^{-/-}$ , siguiendo el protocolo descrito por (Torres PS et al, 2002). Para ello,  $4 \times 10^6$  células/ml se incubaron en presencia y ausencia de anti-CD3 (UCHT-1) a 10  $\mu$ g/ml, y posteriormente se estimularon con un anticuerpo policlonal secundario (*cross-linker*) a una concentración de 20  $\mu$ g/ml (Cappel, Organon Teknika Corp West Chester, PA, USA) durante los tiempos indicados a 37° C. El control de activación empleado fue el pervanadato, con el que se incubaron las células durante 5 minutos a 37° C.

### 3.6. Reorganización de la F-actina.

La polimerización de la F-actina fue determinada mediante citometría de flujo (Gallego MD et al, 1997). Las células ( $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ ) fueron centrifugadas en PBS 1X a 1600 r.p.m. durante 5 minutos. Posteriormente, las células se cultivaron en presencia y ausencia de diferentes estímulos (anti-CD3 (OKT3); PHA-L; Pervanadato) en las concentraciones y tiempos indicados a 37° C. Paralelamente, como control negativo, las células fueron cultivadas con Citocalasina D (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), un potente inhibidor de la reorganización de la F-actina, a una concentración de 3  $\mu$ M durante 45 minutos a temperatura ambiente. Concluida la estimulación, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente permeabilizadas con saponina al 0.1% durante 15 minutos. Luego, las células fueron lavadas, e incubadas con faloidina conjugada con tetrametilisotiocianato (TRITC) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a una dilución 1/50 en PBS 1X-Saponina 0.05% durante 40 minutos a 4° C en la oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS 1X-Saponina 0.05%, resuspendidas en PBS 1X y dispuestas para ser analizadas mediante citometría de flujo.

#### ▪ Inmunofluorescencia y montaje.

Las células ( $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ ) fueron cultivadas en presencia y ausencia de diferentes estímulos: anti-CD3 (OKT3) a 25  $\mu$ g/ml, PHA-L (10  $\mu$ g/ml) y PV 1X durante los tiempos indicados a 37° C. Concluida la estimulación, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) al 0.5% en PBS 1X durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavadas con PBS 1X, al menos dos veces.

Transcurridos los lavados, las células son incubadas con faloidina conjugada con tetrametilisotiocianato (TRITC) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a una dilución 1/50 en PBS 1X-Saponina 0.05% durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas tres veces en PBS 1X. Finalmente, se realizó el montaje con 10µl de Vectashield con DAPI incluido (H-1200, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). Los portaobjetos son almacenados a 4° C y sellados al día siguiente. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss AxioImager.A1 (Carl Zeiss, Microimaging, Thornwood, NJ, USA).

### ▪ **Preparación de los cristales para células no adherentes.**

En el caso de células no adherentes (linfocitos), es necesario preincubar los cristales con Poly-L-Lysina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) al 0.01% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para pegar células no adherentes a los cristales preincubados con Poly-L-Lysina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), debemos tener en cuenta que el frío y el suero inhiben la adherencia de las células a los cristales. Por tanto, debemos emplear medios atemperados y sin suero. Si las células proceden de una electroporación o de un tratamiento severo donde aparecen un elevado número de células muertas, es conveniente realizar un *Lymphoprep* (Amersham International, Little Chalfont, UK) con objeto de evitar que las células muertas se adhieran mucho a los cristales y queden muy sucios.

### ▪ **Reactivos: Inmunofluorescencia.**

- **Solución de permeabilización:** Tritón X-100 0.5% - PBS 1X
- **Tampón de lavado:** PBS 1X-Saponina 0.05%
- **Solución fijadora:** PF 4%- PBS 1X
- **Medio de montaje:** 10µL de Vectashield con DAPI incluido (H-1200, Atom)
- **Solución de adhesión:** Poly-L-Lysine 0.01%-PBS 1X
- **Faloidina conjugada con TRITC:** En una dilución 1/50 en PBS 1X-Saponina 0.05% (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

## 4. Bioquímica.

### 4.1. Obtención del lisado celular completo.

Concluidas las estimulaciones, las células fueron centrifugadas y lisadas en el tampón de lisis (1% Tritón X-100, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% Glycerol, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico, 20mM fluoruro sódico y un “cocktail” inhibidor de fosfatasas) durante 30 minutos a 4° C. Posteriormente, los lisados celulares fueron centrifugados a 14000 r.p.m. durante 10 minutos a 4° C. Concluida la centrifugación, se analizaron directamente en un gel SDS-PAGE o bien se almacenaron a -80° C.

### 4.2. SDS-PAGE, transferencia, bloqueo y revelado.

Los lisados celulares fueron sometidos a una electroforesis SDS-PAGE al 12 % en condiciones reductoras en geles de 0.75 - 1.5mm de espesor (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polyvinylidene Difluoride) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) previamente tratadas con metanol (Panreac Química, S.A., Barcelona, Spain). La transferencia se realizó en condiciones semi-secas durante 90 minutos a 15 voltios. Como control de calidad de la transferencia, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (véase apartado 4.7.). Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas con BSA 5% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) en TBS 1X al 0.1% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en agitación.

Transcurrido el bloqueo de sitios inespecíficos, las membranas fueron incubadas con las diluciones apropiadas para los anticuerpos correspondientes (véase tabla VI) en BSA5% TBST 0.1% durante la noche a 4° C en agitación. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces en TBST 0.1% durante 10 minutos en agitación.

Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario de ratón conjugado con peroxidasa de caballo (Amersham International, Little Chalfont, UK), o bien con un anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa de caballo (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) para los anticuerpos primarios correspondientes en BSA 5% TBST 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces en TBST 0.1% durante 10 minutos en agitación. El revelado de las proteínas fosforiladas ha sido realizado mediante un kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham International, Little Chalfont, UK). A continuación, las membranas fueron expuestas a películas Hyperfilm ECL (Amersham International, Little Chalfont, UK) durante diferentes tiempos de exposición con objeto de obtener una mejor impresión.

### **4.3. Inmunoprecipitación.**

Las células se lisaron en tampón de lisis (véase apartado 4.6.), y posteriormente se recuperaron los sobrenadantes de los lisados en tubos eppendorf. Paralelamente, se realizó el preaclaro de la proteína G-Sefarosa 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech) empleada en estos experimentos. Para ello, se dispuso de 30µl de proteína G-Sefarosa/ eppendorf. Posteriormente, la proteína G-Sefarosa fue lavada con tampón de lisis celular, a 14000 r.p.m. durante 30 segundos, al menos tres veces. En cada lavado, se comprobó visualmente la proteína G-Sefarosa.

Los lisados celulares fueron incubados con la proteína G-Sefarosa durante 1 hora a 4° C en agitación orbital en tubos eppendorf. Concluida la incubación, se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 1 minuto, y se almacenó el sobrenadante procedente del lisado. Este sobrenadante fue incubado durante la noche a 4° C en agitación orbital con el anticuerpo de interés a la concentración indicada. Al día siguiente, se repitió un nuevo preaclaro con la proteína G-sefarosa, y ésta fue añadida al lisado que ha estado incubando con el anticuerpo de interés durante 3 horas a 4° C en agitación orbital. Posteriormente, los lisados fueron lavados con tampón de lisis celular, al menos tres veces. Concluidos los lavados, nos quedamos con la proteína G-Sefarosa. A la proteína G-Sefarosa se le añadió tampón *Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en condiciones reductoras en relación 1:1. Las muestras se encuentran preparadas para ser desnaturalizadas a 95° C durante 5 minutos y ser cargadas en un gel SDS-PAGE (Véase apartado anterior).

### **4.4. Re-blotting.**

Con objeto de analizar una misma membrana de nitrocelulosa/PVDF (Polifloruro de vinilideno) con diferentes anticuerpos específicos. Dicha membrana fue tratada con una solución de re-blot plus (Chemicon International, Temecula, CA, USA) que retira los anticuerpos que previamente hayan sido inmovilizados para su análisis. En primer lugar, empleamos una solución de re-blot plus 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Concluida la incubación, la membrana fue bloqueada con BSA 5% TBST 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, fue lavada en TBST 0.1% durante 10 minutos en agitación. Finalmente, la membrana estaba de nuevo disponible para ser incubada con nuevos anticuerpos específicos.

#### 4.5. Densitometría de bandas.

Las autorradiografías con los tiempos de exposición representativos fueron escaneadas en escala de grises en un escáner Hewlett Packard G30100 Scanjet y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa informático NIH ImageJ (National Institutes of Health). La densidad de las bandas de ERK total o  $\alpha$ -tubulina fue empleada para normalizar los valores de densidad de fosforilación respecto los de proteína total.

#### 4.6. Reactivos: Western-blot / Inmunoprecipitación.

- **Tampón de electroforesis (*Running buffer* (10X)):** 250mM Tris base, 1920mM Glicina y 1% SDS a pH 8.3
- **Tampón de transferencia semi-seca (1X):** 17.5g Glicina, 3.5g Tris base, 240ml de Metanol, 1.2ml de SDS 10% y completar hasta 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada.
- **Tampón de separación (*Separating buffer* (4x)):** 1.5M Tris base completar hasta 200ml de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar a pH 8.8.
- **Tampón de concentración (*Stacking buffer* (4x)):** 0.5M Tris base completar hasta 50ml de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar a pH 6.8.
- **Tampón de lavado (TBST 0.1%):** 50 ml TBS 10X, 450 ml de de H<sub>2</sub>O destilada y 500 $\mu$ L de Tween 20.
- **Solución azul de Coomassie:** 0.25g de azul de Coomassie, 90ml de metanol y 10 ml de ácido acético glacial.
- **Solución de desteñido:** 90ml de metanol y 10 ml de ácido acético glacial.
- **Solución de bloqueo:** 5% BSA 0.1% TBST o bien 5% MLK 0.1 TBST 0.1%.
- **Tampón de lisis:** 1% Tritón X-100, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% Glycerol, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico, 20mM fluoruro sódico y un “cocktail” inhibidor de fosfatasas.
- **Solución de *Stripping*:** Solución Reblot-plus 10X diluida a 1X en H<sub>2</sub>O destilada.
- **Tampón de carga reductor:** 950 $\mu$ L de Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y 50 $\mu$ L de 2- $\beta$ -mercaptoetanol.

## 5. Knock-Down (KD) de CD3.

### 5.1. Diseño y preparación del siRNA.

Se prepararon 100ml del tampón 5X siRNA (100 mM KCl ; 30mM Hepes - pH 7.5 ; 1mM MgCl<sub>2</sub>), y se diluyó a una concentración de 1X en agua DEPC (Dietil Pirocarbonato, inhibidor de RNAasas). Una vez diluido, el siRNA fue almacenado a -20° C, limitando el número de ciclos congelación-descongelación a un máximo de 5 para no perder eficacia.

Concentración siRNA (nmol)	Volumen de tampón 1X a añadir (ml)	Concentración final (mM=pmol/ml)
2.0	0.1	20
<b>5.0</b>	<b>0.25</b>	<b>20</b>
10	0.5	20

$$[20\mu\text{M} = 5\text{nmol} / V (\text{ml}); V (\text{ml}) = 5/20 = 0.4 \text{ ml}; 400\mu\text{l}.]$$

El *pool* de siRNA oligos (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) empleado para estos estudios para el RNAm de CD3 $\gamma$  (NM\_000073) y CD3 $\delta$  (NM\_000732) siGENOME SMART *pool* dúplex a una concentración de 5nmol son los siguientes:

siRNA Target		Sequence target	siRNA Target		Sequence target
Human CD3 $\gamma$	1	UCAAGAAGAUGGUUCGGUAUU	Human CD3 $\delta$	1	GAACAUAGCACGUUUCUCU
	2	CGAGGGGAUGUAUCAGUGUAUU		2	CAAAGAAUCUACCGUGCAA
	3	CCUCAAGGAUCGAGAAGAUUU		3	CGAGGAAUAUAUAGGUGUA
	4	GUACUUUGGCCAGUCAAUUU		4	ACAGAGUGUUUGUGAAUUG

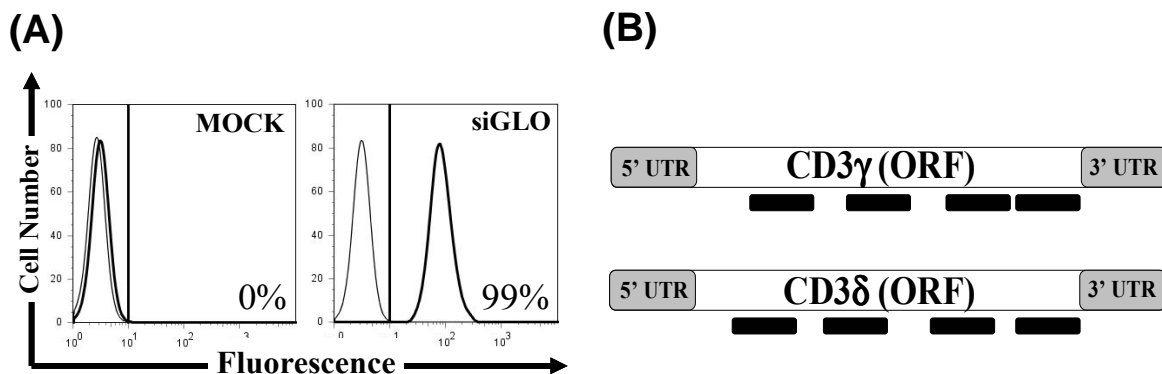
Como control de los experimentos de siRNA se ha empleado un *pool* de siRNA oligos (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) dirigido al RNAm para la Gliceráldehído-fosfato -3-deshidrogenasa humana (GAPDH, NM\_002046) siGENOME SMART *pool* duplex. Además se ha incluido un control adicional con el empleo de un siRNA *Non-targeting pool* (siRNA NT) dirigido hacia un RNAm diana irrelevante.

### 5.2. Transfección mediante electroporación.

Las células fueron cultivadas a la densidad deseada un día antes de la transfección (40-70% de densidad celular). Posteriormente, fueron centrifugadas (1600 r.p.m.- 5 minutos) y resuspendidas en un medio libre de antibióticos y suero (afectan a la transfección) durante la

noche en placas de 24 pocillos con una densidad comprendida entre  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  células/punto (recomendado por el fabricante; Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Al día siguiente, las células fueron lavadas y centrifugadas (1600 r.p.m. - 5 minutos) y el *pellet* celular fue resuspendido en 0.5 ml de tampón de electroporación (TEP) ( 20mM Hepes; 5mM Dextrosa,, 130nM NaCl, 5mM KCl, 0,7 nM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2) empleado para vectores, en el caso de emplear siRNA se empleó el tampón siRNA 1X (véase apartado 5.4.), en las cubetas de electroporación 0.4 cm de ancho (Gene Pulser Cuvette, Bio-Rad) con la concentración indicada de siRNA (100nM) por el fabricante. Posteriormente, electroporamos las células sometiéndolas a las siguientes condiciones: 250mV, 950 $\mu$ F (capacitancia, en Faradios) y resistencia infinita en un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Concluida la electroporación, dejamos a las células que se recuperarán a temperatura ambiente durante unos 5 minutos. Luego, se resuspendieron en 1 ml de FCS y se cultivaron en placa durante 4 horas. Al finalizar las 4 horas, se cambió el FCS por el medio habitual según la línea celular. La viabilidad fue estimada con Trypan Blue (Gibco, BRL) al cabo de 24-48H tras la electroporación.

La monitorización del siRNA incorporado tras la electroporación fue determinada con el empleo de un siRNA trazador (siGLOred, véase material y métodos), este siRNA carece de funcionalidad inhibitoria y se encuentra conjugado con un fluorocromo. El empleo de este oligo nos permitió optimizar las condiciones de la técnica y monitorizar la eficiencia de la electroporación (**Figura 16**). El grado de eficiencia esperado en la electroporación de los siRNA específicos debe ser idéntico al obtenido en el siRNA trazador (siGLOred) a igualdad de condiciones. La mejor detección de la señal emitida por el fluoróforo fue estimada alrededor de las 24 horas.



**Figura 16. (A) Monitorización de la incorporación de un siRNA trazador (siGLOred) mediante citometría de flujo.** Las células T Jurkat ( $\alpha\beta$ TCR) fueron electroporadas con siGLOred a una concentración de 100nM y analizadas al cabo de 24 horas post-electroporación alcanzando un nivel de incorporación del 99% determinado



por citometría de flujo (izquierda). **(B) Representación esquemática del mRNA humano analizado en estos estudios para las diferentes cadenas CD3 ( $\gamma$  o  $\delta$ ), mostrando su ORF (marco abierto de lectura) y los extremos 5' y 3'- UTR.** En la parte inferior de cada mRNA se indica la posición relativa de las dianas para cada *pool* de oligos siRNA (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) específicos empleados en estos estudios.

### **5.3. Efectos a nivel de proteína.**

La determinación de la especificidad del *Knock-Down* transitorio con siRNA, transcurridas 24 horas post-electroporación, y la estimación de la reducción de expresión de las cadenas CD3 fue llevada a cabo mediante citometría de flujo (CD3 $\gamma$ ) y western blot (CD3 $\delta$ ) con anticuerpos específicos.

La expresión de CD3 $\gamma$  fue detectada mediante una tinción intracelular por citometría de flujo con el empleo de un antisuero TG5 (véase **Tabla IV**) que reconoce el tallo intracitoplasmático de la cadena CD3 $\gamma$ , previamente empleado en nuestro laboratorio (**Pacheco-Castro A et al, 1998**), puesto que la caracterización bioquímica de la cadena CD3 $\gamma$  no es muy resolutive en Western Blot, debido a la falta de anticuerpos fiables que detecten con garantías dicha cadena. La validación de la expresión fue corroborada por el empleo de la línea celular JGN (*Jurkat gamma negative*), como control negativo de expresión.

Dicha tinción intracelular se realizó transcurridas 24 a 48H post-electroporación, donde se monitorizó mediante citometría la expresión de las cadenas CD3 con anticuerpos o antisueros específicos (véase **Tabla VI**) en las células tratadas con siRNA y en las no tratadas.

La expresión de CD3 $\delta$  fue detectada con el empleo de anticuerpos específicos para dicha cadena (véase tabla VI) mediante western-blot. Las células silenciadas fueron lisadas y analizadas mediante western-blot para las diferentes cadenas CD3 con anticuerpos específicos.

Una vez confirmado el *Knock-Down* de ambas cadenas CD3, se realizó un análisis de la expresión del complejo TCR/CD3 en superficie para así evaluar los efectos del KD de CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  en las células silenciadas. De modo que transcurridas 24 a 48h tras la electroporación, se monitorizó mediante citometría de flujo extracelular la expresión del

complejo TCR/CD3 en las células tratadas y las no tratadas, con una amplia batería de anticuerpos específicos para el TCR o sus subunidades CD3(véase **Tabla IV**).

### 5.4. Reactivos: siRNA.

- **5X siRNA buffer:** 100 mM KCl ; 30mM Hepes - pH 7.5 ; 1mM MgCl<sub>2</sub>
- **Tampón de electroporación:** 20mM Hepes; 5mM Dextrosa, 130nM NaCl, 5mM KCl, 0,7 nM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2
- **1X siRNA buffer:** Diluir 5X siRNA buffer a 1X en agua DEPC.
- **Tampón de electroforesis TAE 50X:** Para un volumen de un 1L se empleará 242g Tris base, 57.1mL de ácido acético glacial y 18.6g EDTA. Se completará hasta alcanzar el volumen deseado con agua destilada.
- **Bromuro de Etidio (BrTr):** Disolver 0.2g de BrEt a partir de un stock (10mg/mL) en 20mL de agua destilada. Debe ser almacenado a 4° C y en oscuridad.
- **Gel de agarosa 1-2%:** Para un volumen de 100mL de TAE 1X emplear 1 ó 2 gramos de agarosa, respectivamente. Posteriormente se añade 6-7µL de BrEt.



## 1. Señalización en la deficiencia congénita de CD3 $\gamma$

### 1.1. Linfocitos T transformados, en respuesta a anti-CD3.

Datos previos de nuestro laboratorio obtenidos en células deficientes en CD3 $\gamma$  transformadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS) indican que la señalización vía TCR/CD3 en ausencia de dicha cadena está bastante preservada, aunque algunas funciones, entre las cuales la fosforilación temprana de algunos intermediarios de señalización (40, 42, 70 y 81kD), la internalización mediada por PMA y funciones tardías como la síntesis de IL-2 se encuentran más afectadas que otras, como la proliferación (Pacheco-Castro A et al, 1998; Torres PS et al, 2002; Recio MJ et al, 2007). Estos hallazgos sugieren un posible papel específico para la cadena CD3 $\gamma$  en determinadas funciones, por tanto, con el objeto de esclarecer y delimitar exhaustivamente el papel de CD3 $\gamma$  en la señalización intracelular, nos hemos propuesto analizar con mayor detenimiento los eventos tempranos (fosforilación de intermediarios de señalización) y tardíos (reorganización del citoesqueleto, la proliferación y expansión de las células iNKT) involucrados en la activación del complejo TCR/CD3 en ausencia de CD3 $\gamma$  en las líneas transformadas.

#### 1.1.1. Defectos en la fosforilación de TCR $\zeta$ y en la defosforilación de NFAT.

Los eventos intracelulares más tempranos que siguen el reconocimiento antigénico del complejo TCR/CD3 son la fosforilación de los motivos ITAMs localizados en la región intracelular de las cadenas CD3 ( $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$ ) y TCR $\zeta$ . Una vez fosforilados, los motivos ITAMs permiten el reclutamiento de diferentes proteínas tirosina – quinasas (PTK) las cuales son activadas tras su asociación, constituyendo la etapa más temprana de la señalización intracelular.

El análisis de la fosforilación de la cadena TCR $\zeta$  ha sido llevado a cabo mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fosfo-tirosina (clon 4G10), sobre lisados de células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  que habían sido previamente estimuladas en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1; 10 $\mu$ g/mL) durante los tiempos indicados (**Figura 17**). Posteriormente, y tras someter los lisados a PAGE-SDS, se realizó la inmunodetección con un anticuerpo específico anti-TCR $\zeta$  (clon 6B10.2). Nuestros resultados mostraron una fosforilación ligeramente defectuosa en comparación con las células T control (**Figura 17**).

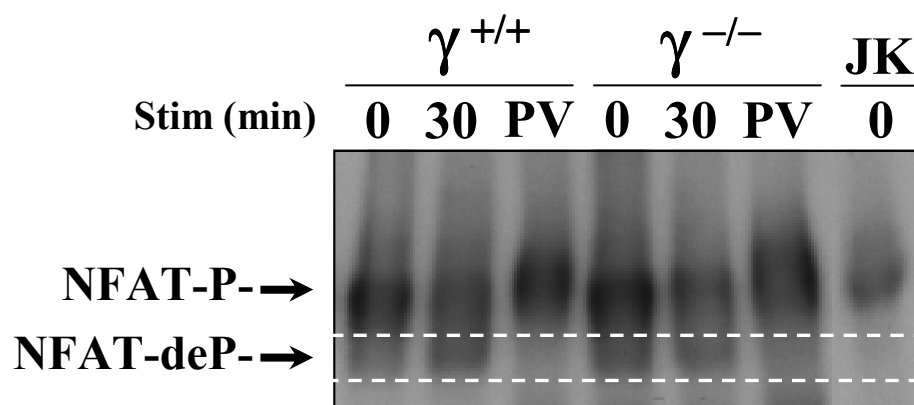
La baja expresión del complejo TCR/CD3 en células T deficientes en CD3 $\gamma$  y el defecto leve de la fosforilación de TCR $\zeta$  no suponen defectos posteriores en la fosforilación de intermediarios tardíos de la señalización intracelular como veremos más adelante. Estos resultados corroboran datos previos de nuestro laboratorio que han demostrado que la cadena CD3 $\gamma$  es necesaria para la incorporación adecuada de la cadena TCR $\zeta$  en el complejo TCR/CD3 (**Zapata DA et al, 2004**).

El factor de transcripción NFAT (Factor Nuclear de células T activadas) se identificó en un principio en células T como un complejo inducible que se unía al elemento de respuesta a antígeno en el promotor del gen de la IL- 2 (**Crabtree GR et al, 2002; Rao A, 2009**). La forma activada de NFAT (forma desfosforilada) es la única capaz de translocarse al núcleo y desde allí unirse al promotor de la IL-2 (**Figura 13**).

Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que algunas funciones tardías como la síntesis de IL-2 se encuentran afectadas en ausencia de CD3 $\gamma$  (**Pacheco-Castro A et al, 1998**). Por tanto, nos propusimos analizar la forma activada de NFAT en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1). Nuestros resultados mostraron que la desfosforilación de NFAT es parcialmente defectuosa en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) para los tiempos indicados (**Figura 18**). Tras la activación del complejo TCR/CD3, se observó que la forma inactiva de NFAT es predominante en comparación con la activa. Estos resultados sugieren que la activación defectuosa del factor NFAT en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) podría estar relacionada con los defectos previamente descritos en la síntesis de IL-2. El pervanadato fue empleado como control negativo puesto que tras la estimulación sólo podemos detectar la forma inactiva de NFAT y por tanto la forma completamente fosforilada.



**Figura 17. Fosforilación de la cadena TCR $\zeta$  en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .** La fosforilación de la cadena TCR $\zeta$  fue detectada mediante inmunoprecipitación con anticuerpos fosfo-tirosina (clon 4G10) y posterior inmunodetección con un anticuerpo específico de TCR $\zeta$  (Clon 6B10.2) tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 para los tiempos indicados.



**Figura 18. Desfosforilación del Factor Nuclear de células T Activadas (NFAT) en células T deficientes en CD3 $\gamma$  transformadas con HVS.** El análisis de la desfosforilación del NFAT mostró una desfosforilación parcialmente defectuosa en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) a los tiempos indicados. Como control negativo de la desfosforilación se ha empleado el pervanadato (PV).

### 1.1.2. Fosforilación de las proteínas ZAP-70, LAT y las MAPK ERK y p38 normal.

La proteína tirosina quinasa ZAP-70 ejerce un papel crítico en la señalización intracelular de las células T en respuesta al reconocimiento antigénico reclutando a los ITAMs fosforilados de la cadenas CD3 $\zeta$  del complejo TCR/CD3 (**Figura 9**).

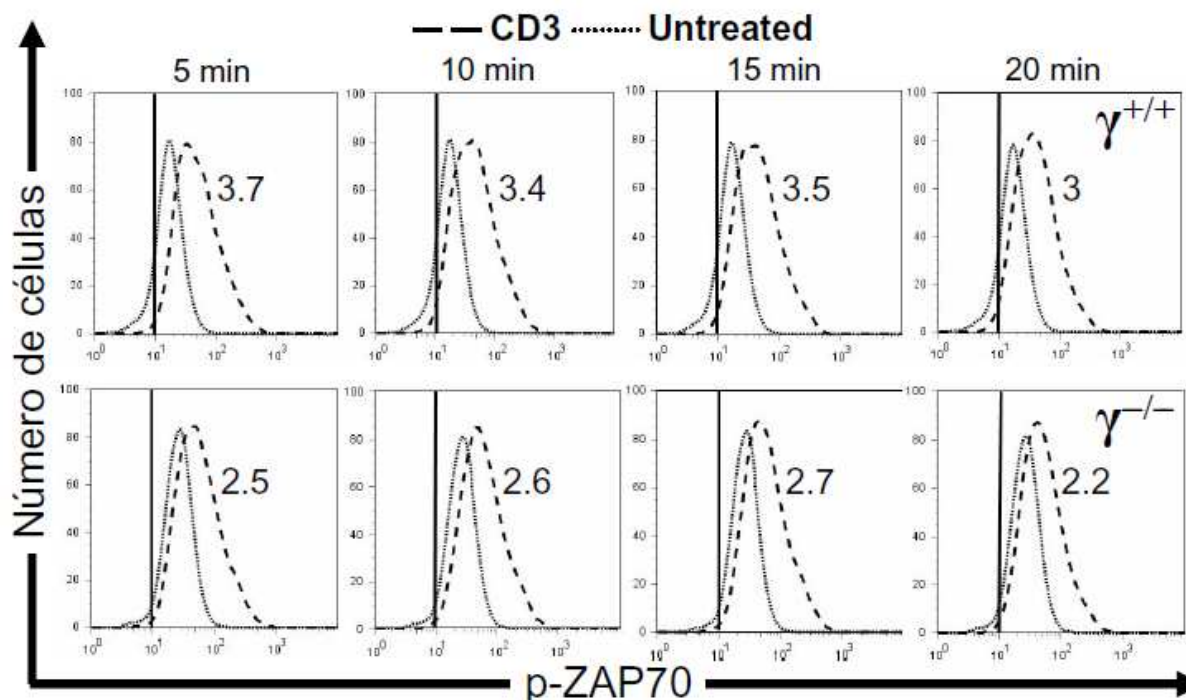
El análisis de la fosforilación de ZAP-70 en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) en células deficientes en CD3 $\gamma^{-/-}$  transformadas con HVS ha sido llevado a cabo mediante citometría de flujo. Debido a la naturaleza transitoria de los eventos de fosforilación, las células una vez estimuladas fueron fijadas inmediatamente con objeto de preservar el estado de fosforilación (**Krutzik PO et al 2011, 2004, 2003; Pérez OD et al, 2005**). Posteriormente fueron permeabilizadas y finalmente teñidas para ser analizadas mediante citometría de flujo.

La detección de la fosforilación de ZAP-70 fue llevada a cabo con el empleo de un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de ZAP-70 (clon Tyr319/Tyr352) mediante citometría de flujo intracelular. Como control positivo de la fosforilación y estímulo TCR/CD3 independiente, se ha empleado pervanadato (PV), y como control negativo se analizó la fosforilación de ZAP-70 en células B transformadas con el virus de Epstein-Barr (EBV). Además, se han empleado controles de inespecificidad de la tinción intracelular empleando un suero de conejo irrelevante dirigido frente a la proteína MR1 (molécula MHC-I no clásica) y un anticuerpo secundario de ratón conjugado con ficoeritrina (PE).

El análisis de la fosforilación de ZAP-70 en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) en células deficientes en CD3 $\gamma$  mostró una fosforilación equivalente en comparación con las células control, a pesar del defecto leve de fosforilación observado previamente en la cadena TCR $\zeta$  (**Figura 17**). Sin embargo, con el objeto de determinar si la fosforilación de ZAP-70 es defectuosa a tiempos tardíos, se analizó mediante citometría de flujo intracelular la fosforilación en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) a diferentes intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 20 minutos (**Figura 19**).

Los resultados obtenidos de la cinética de tiempos mostraron que la fosforilación de ZAP-70 fue normal en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1), y además fue sostenida

en el tiempo, de modo que en ausencia de CD3 $\gamma$  la fosforilación de esta proteína ZAP-70 es completamente normal en las líneas transformadas con HVS.

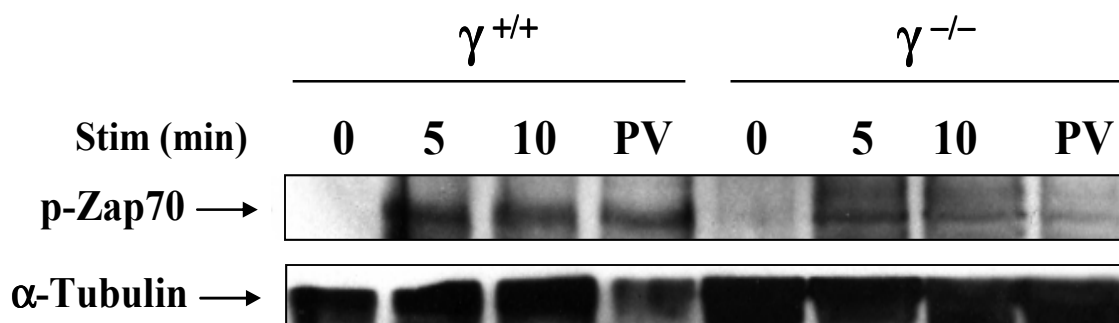


**Figura 19. La fosforilación de la proteína ZAP-70 es sostenida en el tiempo en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .** Las células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  fueron estimuladas en presencia (línea discontinua) y ausencia (línea punteada) en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) para los tiempos indicados. Los números en cada histograma indican el ratio de intensidad media de fluorescencia entre células estimuladas y no estimuladas tanto para células T control como para células T deficientes.

En paralelo se analizó la fosforilación de la proteína tirosina quinasa ZAP-70 en células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  mediante western-blot. Las células fueron estimuladas a diferentes intervalos de tiempo y posteriormente lisadas, luego fueron sometidas a SDS-PAGE y posterior inmunodetección con un anticuerpo específico que reconoce la forma fosforilada de ZAP70 (Clon Tyr319/Tyr352). Se observó que la cantidad de proteína fosforilada ZAP-70 es menor en las células deficientes en CD3 $\gamma$  en comparación con las células T control transformadas con HVS (**Figura 20**). Sin embargo, a pesar de presentar una menor cantidad de proteína ZAP-70, el nivel de fosforilación alcanzado fue equivalente a las células T control.

Estos resultados indican que en ausencia de CD3 $\gamma$  la fosforilación de la proteína tirosina quinasa ZAP-70 no se encuentra afectada y es equiparable a las células T control, a pesar de presentar una menor cantidad de proteína. Por tanto, la cadena CD3 $\gamma$  presenta un papel prescindible en la fosforilación de dicha proteína.



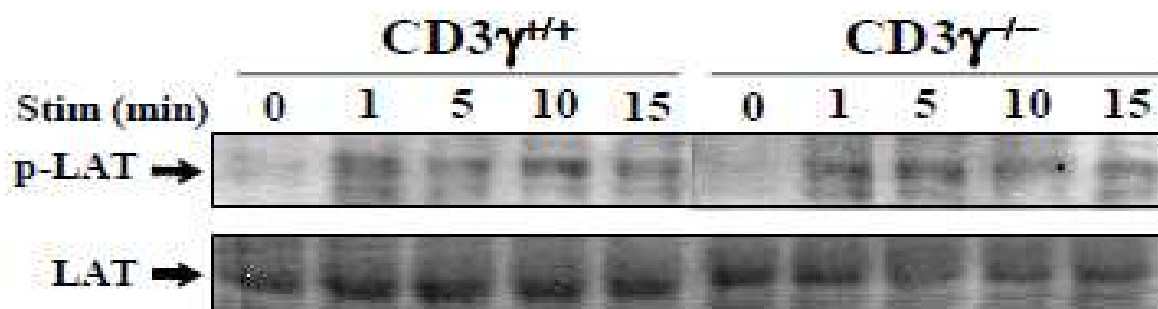


**Figura 20.** La cantidad de proteína fosforilada de ZAP-70 es menor en células T deficientes en CD3 $\gamma$ . La fosforilación de ZAP-70 fue analizada en respuesta a anticuerpos anti-CD3(UCHT-1) y pervanadato a los tiempos indicados. Los resultados muestran que la cantidad de proteína fosforilada de ZAP-70 es menor en comparación con las células T control.

La proteína adaptadora LAT (*Linker of activated T cells*) presenta un peso molecular aproximado de 36-38Kd. Se expresa en células T y NK aunque también se ha detectado minoritariamente su expresión en mastocitos, megacariocitos y plaquetas (Malissen B et al, 2005). Se caracteriza por carecer de actividad quinasa y presentar un elevado número de dominios de unión SH-2 y SH-3, lo que le permite el reclutamiento de diferentes intermediarios de señalización.

La proteína LAT es sustrato directo de ZAP-70 y es rápidamente fosforilada tras el reconocimiento antigénico del complejo TCR/CD3 (Zhang W et al, 1998). El análisis de la fosforilación de LAT ha sido llevado a cabo mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-fosfo-tirosina (clon 4G10) sobre lisados de células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  que habían sido previamente estimuladas con anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1; 10 $\mu$ g/mL) durante los tiempos indicados (Figura 21).

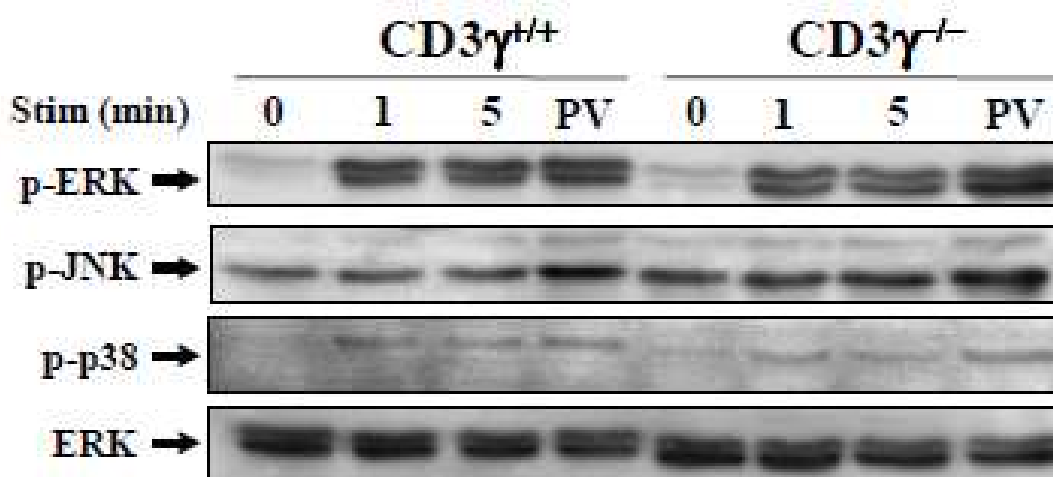
Posteriormente, y tras someter los lisados a PAGE-SDS, se realizó la inmunodetección con un anticuerpo específico anti-LAT (clon 2E9). Nuestros resultados indicaron que la fosforilación de la proteína LAT en ausencia de CD3 $\gamma$  es similar a la fosforilación observada en las células T control (Figura 21). Por tanto, los resultados obtenidos indican que la fosforilación de la proteína adaptadora LAT en respuesta a anticuerpos anti-CD3 es completamente normal en ausencia de CD3 $\gamma$  y además es sostenida en el tiempo.



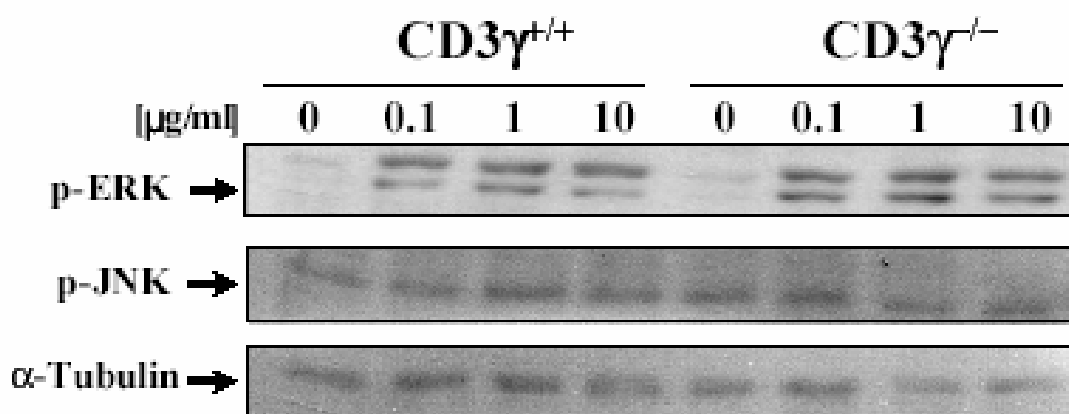
**Figura 21. La fosforilación de la proteína adaptadora LAT es normal en células T deficientes en CD3 $\gamma$ .** La fosforilación de la proteína LAT fue detectada mediante inmunoprecipitación con anticuerpos fosfo-tirosina (clon 4G10) y posterior inmunodetección con un anticuerpo específico de LAT (Clon 2E9). No se observaron diferencias de fosforilación en las células T deficientes en CD3 $\gamma$  en comparación con las células T control en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) para los tiempos indicados.

La familia de la MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) comprende un importante número de Serina/Treonina quinasas que se encuentran directamente relacionadas con la supervivencia y la diferenciación celular (O'Reilly LA et al, 2009; Fisher AM et al, 2005). Además, algunos de sus miembros están directamente relacionados con factores de transcripción como NFAT (Hickman SP et al, 2006; Gómez del Arco P et al, 2000; Martelli MP et al, 2000). Para descartar posibles defectos en la fosforilación de la ruta de las MAPK en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$ , se realizó el análisis de la fosforilación de algunos miembros de esta familia de proteínas como ERK y p38 en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) a diferentes tiempos (0, 5 y 10 min). El análisis de la fosforilación de las diferentes proteínas fue llevado a cabo mediante inmunodetección secuencial en la misma membrana con anticuerpos fosfo-específicos dirigidos hacia cada una de las proteínas.

Transcurrida la activación, en la inmunodetección de fosfo-ERK con un anticuerpo fosfo-específico (clon E4) la fosforilación de un doblete de proteínas con masas aparentes de 42 y 44Kd, correspondientes a las isoformas ERK1 y ERK2 respectivamente. La fosforilación de ambas isoformas fue similar en comparación con las células T control (**Figura 22**). Asimismo, se analizó la fosforilación de ERK a concentraciones limitantes (0.1 - 10 $\mu$ g/ml) de anticuerpo anti-CD3(UCHT-1). Los resultados mostraron una fosforilación completamente normal de las células deficientes en CD3 $\gamma$  y en las células T control. Luego se realizó un “stripping” sobre la misma membrana que posteriormente fue incubada con anticuerpos fosfo-específicos dirigidos hacia las formas fosforiladas de JNK y de p38. El control de carga de proteína en cada calle fue determinado con un anticuerpo dirigido hacia la  $\alpha$ -tubulina (clon B.1.5.2) (**Figura 23**)

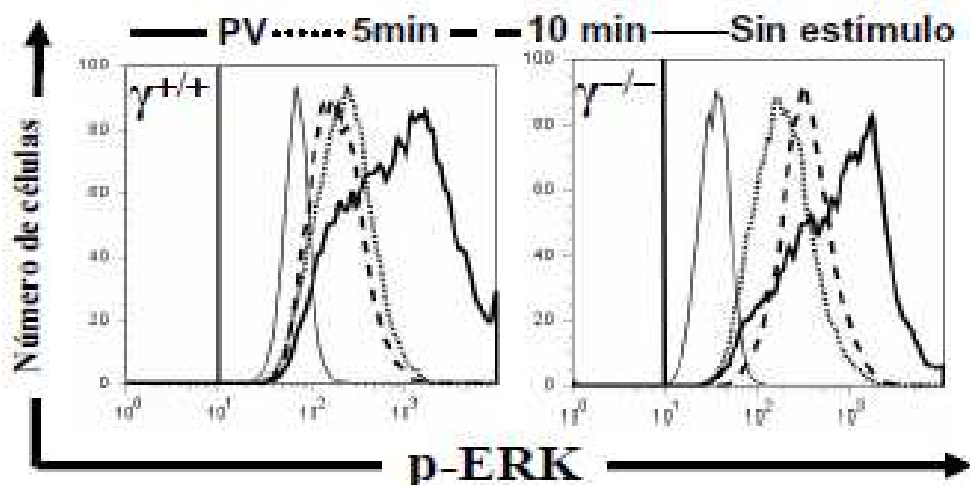


**Figura 22. Activación en respuesta a TCR de las MAP kinasas ERK, JNK y p38 en células T deficientes en CD3  $\gamma$  transformadas con HVS.** Trás la estimulación con anti-CD3 a los tiempos indicados, o con pervanadato (PV) durante 5 minutos, se analizó la inducción de ERK, JNK y la fosforilación de p38 mediante inmunoblot secuencial de lisados celulares y el uso de anticuerpos fosfo-MAP-kinasas específicos. Se utilizó anticuerpo ERK total en el inmunoblot de control de carga.



**Figura 23. Respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3 en células T deficientes en CD3  $\gamma$  transformadas con HVS.** Células T control y deficientes en CD3  $\gamma$  en humanos fueron estimuladas con mAb anti-CD3 soluble (UCHT-1) a diferentes concentraciones según lo indicado (0.1-10 $\mu$ g/ml) durante 5 min. Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpos contra ERK y JNK fosforilados. Se utilizó  $\alpha$ -Tubulin como control de carga.

Paralelamente, se analizó la fosforilación de ERK en respuesta a anticuerpos anti-CD3 y pervanadato mediante citometría de flujo con anticuerpos fosfo-específicos. Debido a la naturaleza transitoria de los eventos de fosforilación, las células fueron fijadas para preservar su estado activado y luego fueron permeabilizadas y teñidas con un anticuerpo específico dirigido a la proteína fosforilada ERK. Los resultados obtenidos son consistentes con los observados previamente mediante western-blot, por tanto podemos decir que la fosforilación de ERK fue similar en células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  (**Figura 24**).



**Figura 24. Análisis de la fosforilación de ERK mediante citometría de flujo intracelular de células T deficientes en CD3 $\gamma$ .** La fosforilación de ERK fue completamente normal en células T deficientes en CD3 $\gamma$  en respuesta a anticuerpos CD3 (UCHT-1) y pervanadato. Estos resultados corroboran los observados previamente mediante western-blot.

La fosforilación de la proteína p38-MAPK fue detectada con un anticuerpo fosfo-específico (clon Thr180/Tyr182) que reconocía la forma activa y fosforilada de la proteína p38 en lisados celulares procedentes de células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  transformadas con HVS. Tal y como lo indica la **figura 22**, nuestros resultados mostraron una fosforilación normal de la proteína p38 en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) y pervanadato en células T control y deficientes en CD3 $\gamma$ . La cantidad de proteína total fue determinada con un anticuerpo específico de la proteína ERK total (clon 3A7) y con un anticuerpo dirigido hacia la  $\alpha$ -tubulina (clon B.1.5.2).

Los resultados obtenidos nos indican que en ausencia de CD3 $\gamma$  no se observan diferencias en la fosforilación de ERK y p38 MAPK (**Figura 22**). Por tanto, la cadena CD3 $\gamma$  no es imprescindible para la activación de la ruta de ambas proteínas pertenecientes a las MAPK.

### 1.1.3. Fosforilación de las proteínas Vav y JNK constitutiva.

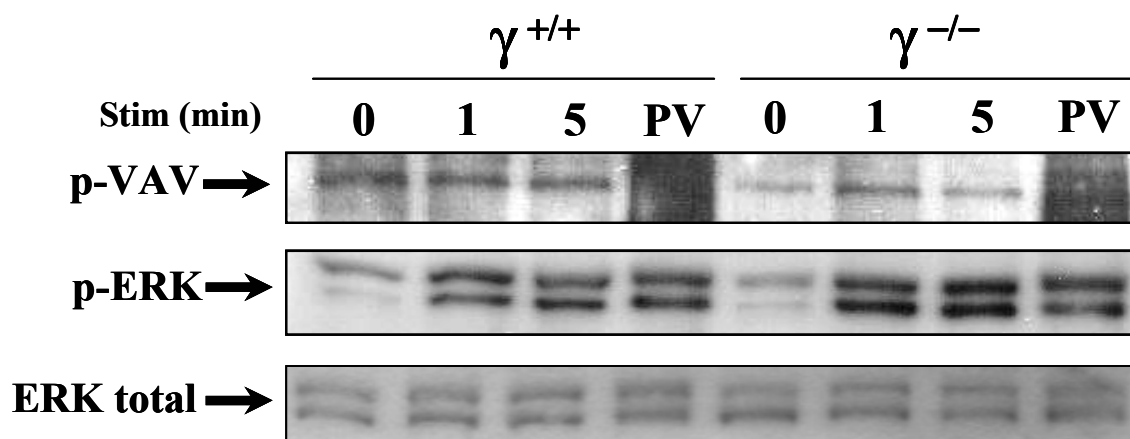
La proteína Vav, con un peso molecular de 95Kd, pertenece a la familia Dbl y se expresa en células del sistema hematopoyético y trofoblastos. Se caracteriza por presentar una actividad GEF (Factor intercambiador de nucleótidos de guanina) con proteínas GTPasas y

está vinculada con la reorganización del citoesqueleto así como con la activación de diferentes intermediarios de señalización como JNK, p38 MAPK y factores de transcripción como NFAT.

Se ha analizado la fosforilación de la proteína Vav en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) en células deficientes en CD3 $\gamma$  transformadas con HVS, mediante western-blot (WB) y con el empleo de anticuerpos específicos que detectan la forma fosforilada de Vav (clon Tyr 174). Los resultados obtenidos nos indican que la cantidad de proteína fosforilada Vav es menor en células T deficientes ( $\gamma^{-/-}$ ) que en células control ( $\gamma^{+/+}$ ) (**Figura 25**). Sin embargo, se detectaron niveles de fosforilación constitutivos de la proteína Vav en respuesta a anticuerpos CD3(UCHT-1) a los tiempos indicados (**Figura 25**). Por tanto, la fosforilación constitutiva de la proteína Vav en las líneas transformadas HVS no es informativa.

La activación celular del complejo TCR/CD3 fue comprobada mediante el empleo de otros anticuerpos fosfo-específicos, en la misma membrana, dirigidos hacia otras proteínas de señalización intracelular como ERK pertenecientes a la familia de las MAPK, siendo esta fosforilación completamente normal. Por tanto la proteína Vav en líneas transformadas HVS en ausencia de CD3 $\gamma$  se presenta con una actividad basal constitutiva similar a la observada en las células T control, a pesar de presentar una menor cantidad de proteína fosforilada (**Figura 25**).

Otra de las proteínas analizadas en las líneas transformadas HVS y que presentó una fosforilación constitutiva fue JNK. Esta proteína pertenece a la familia de las MAPK y fue analizada con un anticuerpo fosfo-específico (clon G7) en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) a diferentes tiempos (**Figuras 22 y 23**). Los resultados mostraron una fosforilación constitutiva de la proteína JNK en células T control y deficientes en CD3 $\gamma$  transformadas con HVS (**Figuras 22 y 23**). Por tanto, el análisis de dicha fosforilación no es informativo en líneas transformadas con HVS.

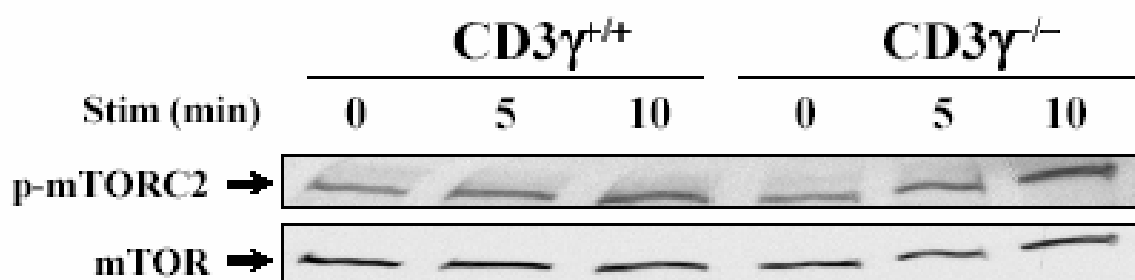


**Figura 25. Fosforilación de la tirosina de Vav inducida mediante TCR.** El nivel de fosfo-Vav fue constitutivo y más bajo en células T deficientes en CD3  $\gamma$  que en células T control estimuladas. Al contrario, el nivel de fosfo-ERK analizado mediante inmunoblot fue similar en células T control y en células T deficientes en CD3  $\gamma$  transformadas con HVS. El control de carga se comprobó mediante inmunoblot con anticuerpo total ERK.

#### 1.1.4. Fosforilación de mTORC2 normal.

La proteína serina/treonina quinasa mTOR pertenece a la familia de las PI-3 quinasas (PIKKs) que ejercen un importante papel en la coordinación del crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes y al estado energético celular (Copp J et al, 2009). Se encuentra constituida por dos subunidades catalíticas conservadas en la evolución que participan en la señalización intracelular. La actividad de la primera subunidad (mTORC-1) está relacionada con la respuesta a factores de crecimiento, mientras que la segunda (mTORC-2) regula la organización de la actina en el citoesqueleto y activa a la proteína Akt durante la señalización intracelular.

Debido a que la subunidad catalítica mTORC-2 ejerce un papel estrechamente vinculado con la organización de actina, nos propusimos analizar la fosforilación de mTORC-2 en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1) en células deficientes en CD3 $\gamma^{-/-}$  transformadas con HVS. Nuestros resultados indicaron que la fosforilación de mTORC-2 (clon Ser2481) era similar a la observada en las células T control (Figura 26). Estos resultados indican que en ausencia de CD3 $\gamma$  la fosforilación de la proteína serina/treonina quinasa mTORC-2 no se encuentra afectada. El control de carga de proteína en cada calle fue determinado con un anticuerpo dirigido hacia la proteína total mTOR (clon L27D4).



**Figura 26. Fosforilación de la proteína mTORC-2 en células T deficientes en CD3 $\gamma$  normal.** La fosforilación de mTORC-2 fue analizada en respuesta a anticuerpos anti-CD3 para los tiempos indicados. Los resultados muestran que la fosforilación de mTORC-2 es completamente normal en comparación con las células T control.

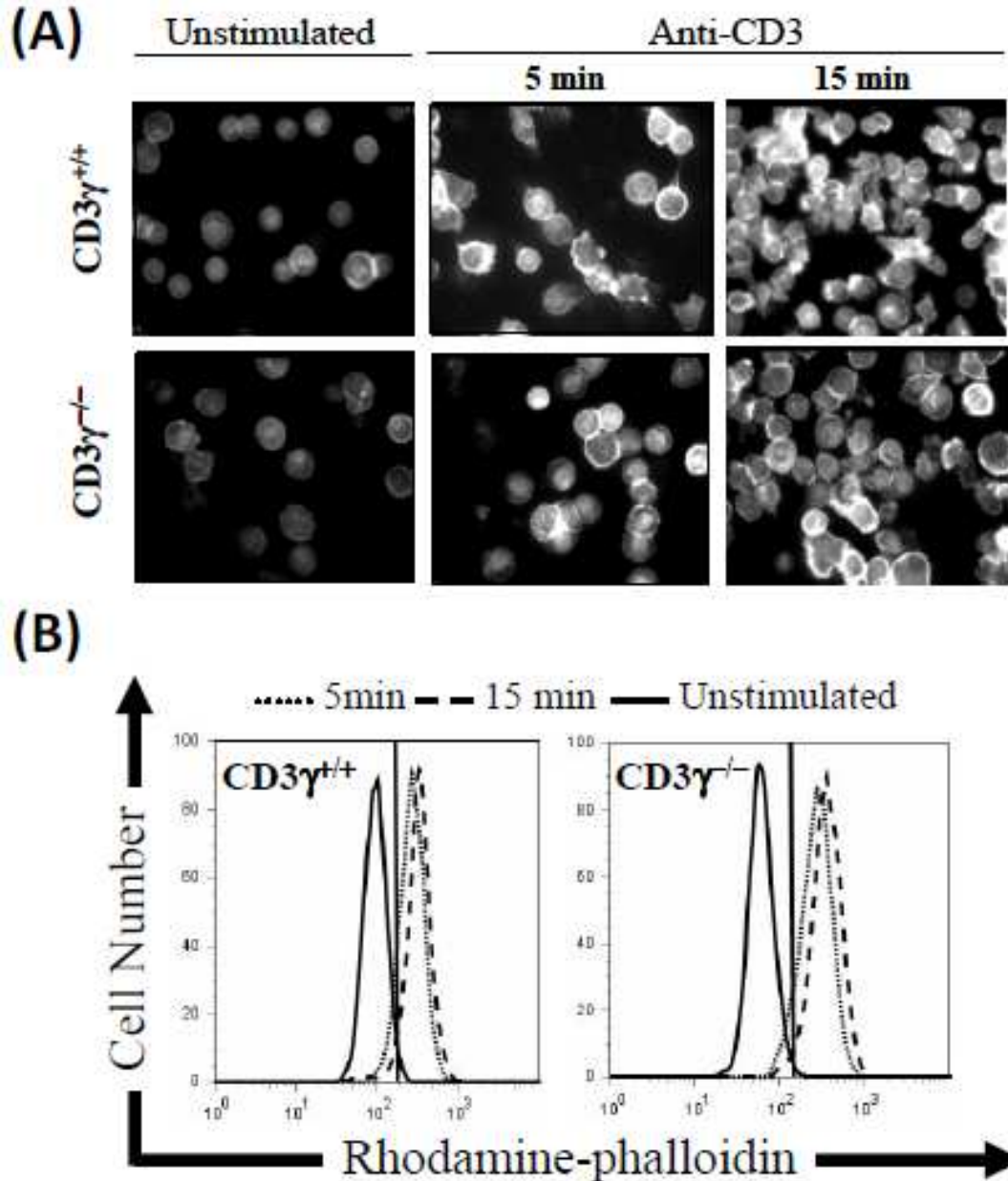
### 1.1.5. Reorganización de la actina filamentosa normal.

La activación de la célula T como consecuencia del reconocimiento antigénico da lugar a la reorganización del citoesqueleto de actina en el lugar donde se produce la sinapsis inmunológica, lo que resulta en la polimerización focalizada de la actina filamentosa (F-actina) en la zona de contacto entre la célula T y la APC (Kaizuka Y et al, 2007; Tskvitaria-Fuller I et al, 2003; Cannon JL et al, 2002; Penninger JM et al, 1999). Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la cadena CD3 $\gamma$  es requerida en la adhesión y polimerización de actina a través del complejo TCR/CD3 (Torres PS et al, 2002). Con el objeto de acotar aún más el papel de dicha cadena en este proceso, se analizó la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a anticuerpos anti-CD3, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.

El análisis de la reorganización del citoesqueleto mediante inmunofluorescencia en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (OKT3) inmovilizados en placa fue llevado a cabo mediante el empleo de faloidina conjugada con TRITC (Tetra-metil-isotiocianato). En ausencia de estimulación (tiempo 0), no se observaron diferencias en los niveles basales de reorganización de la F-actina en células T control y deficientes para CD3 $\gamma$ . Tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 a diferentes tiempos, se observó un incremento en la cantidad de F-actina en aquellas zonas donde se produce el reconocimiento, siendo este incremento similar en células control y deficientes en CD3 $\gamma$  (Figura 27A). En la fase temprana de la respuesta (5 minutos) se observó una distribución difusa de la F-actina en el citoplasma, con un refuerzo adyacente a la membrana interna de la célula que conforma el anillo de actina. La reorganización del citoesqueleto de actina progresó durante el tiempo de estimulación y fue

acompañada con la presencia de pseudopodos transcurridos 15 minutos después de la estimulación (**Figura 27A**). Paralelamente, mediante citometría de flujo, se analizó la reorganización de la F-actina en respuesta a anticuerpos CD3 (UCHT-1) a diferentes tiempos de acuerdo con la metodología descrita previamente en líneas transformadas HVS (**Gallego MD et al, 1997**). Los resultados observados son consistentes con los observados previamente mediante inmunofluorescencia, e indican que a tiempos tempranos la cadena CD3 $\gamma$  no es requerida en la reorganización del citoesqueleto (**Figura 27B**).



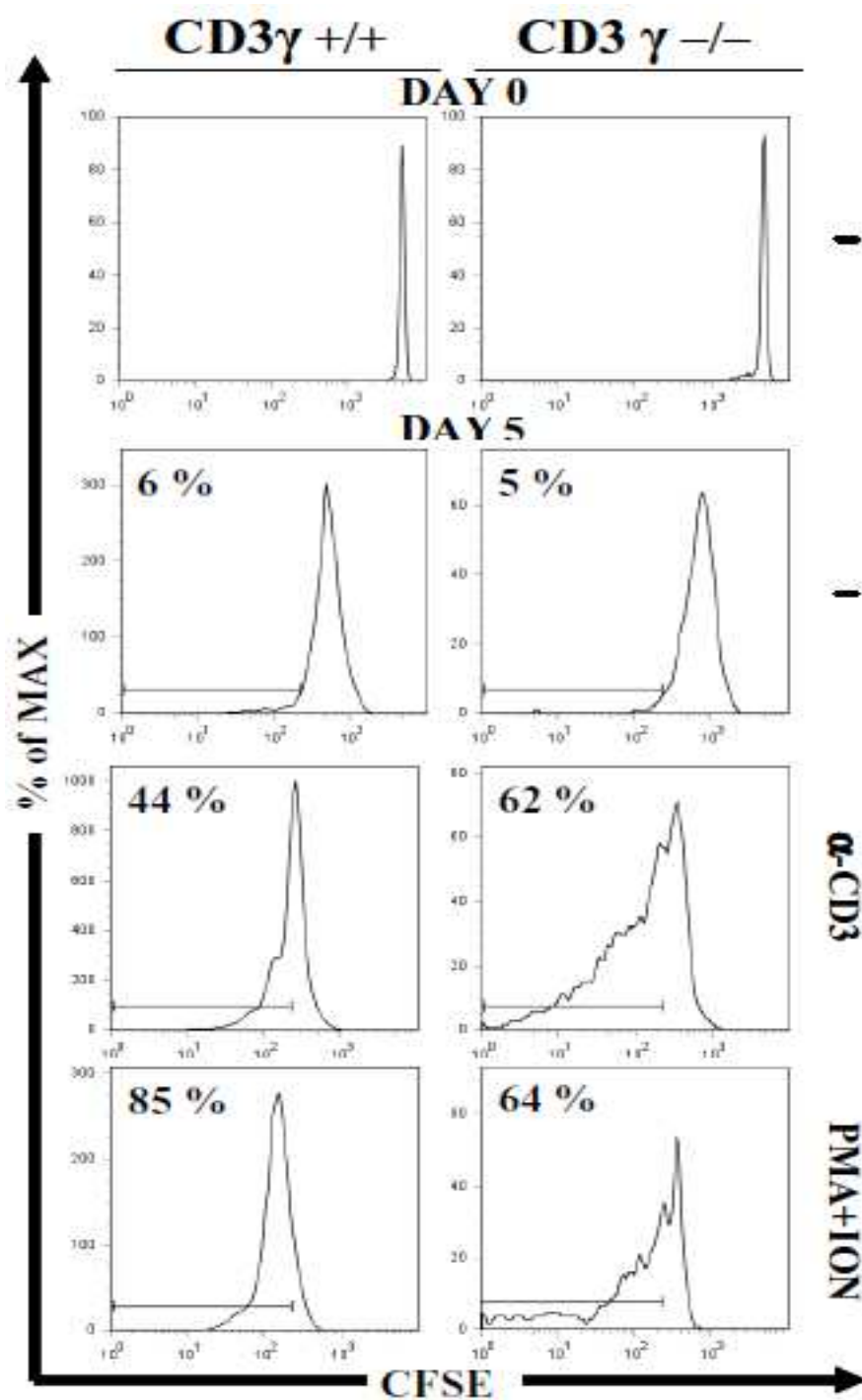


**Figura 27. (A) Reorganización de filamentos de actina normal en respuesta a CD3 en células T deficientes en  $CD3\gamma$  transformadas con HVS.** Células T control y deficientes en  $CD3\gamma$  en humanos fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 inmovilizados en los tiempos indicados, luego se fijaron, permeabilizaron, y tiñeron con rodamina-falloidina, y finalmente analizadas mediante inmunofluorescencia. **(B) Las células T deficientes en  $CD3\gamma$  transformadas con HVS polimerizan la actina en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD3.** Células T control y deficientes en  $CD3\gamma$  fueron estimuladas con anti-CD3 soluble para los tiempos indicados, luego se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con rodamina-falloidina, y finalmente se analizaron mediante citometría de flujo. Los perfiles de fluorescencia de células estimuladas durante 5 minutos (línea punteada) o 15 minutos (línea discontinua) en comparación con células no estimuladas (línea continua) se encuentran solapados. El incremento de la intensidad de fluorescencia indica un rápido cambio de actina-G a actina-F en células T control y deficientes en  $CD3\gamma$  en respuesta a anti-CD3.

### 1.1.6. Proliferación en ausencia de CD3 $\gamma$ normal.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la proliferación en las células T deficientes para CD3 $\gamma$  era normal en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (**Torres PS et al, 2002**). Pese a ello, nos propusimos analizar la proliferación celular mediante el colorante lipofílico fluorescente (CFSE) que ofrece una mayor sensibilidad y permite cuantificar la proliferación mediante citometría de flujo (**Lyons AB et al, 2000**).

Por tanto, las células T deficientes y controles transformadas con HVS se marcaron con CFSE y fueron estimuladas durante 5 días en ausencia o presencia de anticuerpos anti-CD3 (Clon UCHT-1). Como control de proliferación las células fueron estimuladas en ausencia y presencia con estímulos independientes del complejo TCR (PMA junto con ionomicina). Nuestros resultados indicaron que las células deficientes son capaces de proliferar con normalidad frente a los diferentes estímulos y avalan los resultados previos obtenidos por nuestro laboratorio (**Figura 28**).



**Figura 28. Proliferación celular de las células deficientes en CD3 $\gamma$  normal en respuesta a anticuerpos anti-CD3.** Las células fueron cultivadas durante 5 días en presencia y ausencia a los diferentes estímulos en células T control (panel izquierdo) y deficientes (panel derecho) transformadas con HVS. El porcentaje en la parte superior izquierda de cada histograma indica la capacidad de proliferación de dichas células frente a cada uno de los diferentes estímulos.

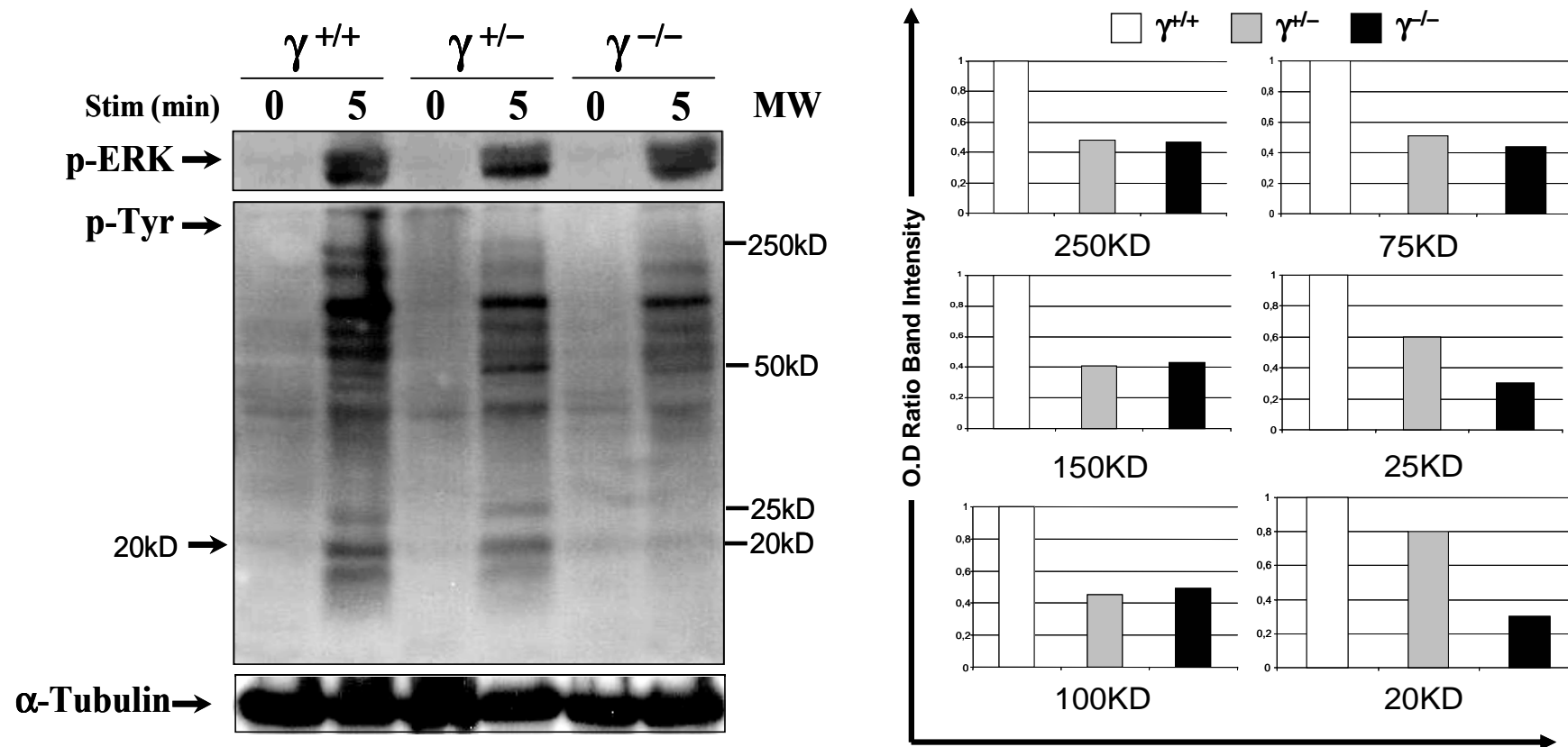
## 1.2. Linfocitos T transformados, en respuesta a pervanadato.

El peróxido de vanadato (pervanadato) ha sido previamente descrito como un inhibidor de fosfatasas que incrementa rápidamente el nivel de fosforilación de tirosinas en células en reposo (Evans GA et al, 1994; Imbert V et al, 1994; Secrist JP et al, 1993; Jin YJ et al, 1998). Además es empleado habitualmente como control positivo de la fosforilación independiente del complejo TCR/CD3.

En nuestro laboratorio, hemos observado que tras la estimulación con pervanadato, la fosforilación de tirosinas detectada con un anticuerpo fosfo-específico (clon 4G10) es defectuosa para un amplio rango de proteínas de diferente peso molecular (250, 150, 100, 75, 25 y 20 kD) en células T transformadas procedentes de heterocigotos y deficientes en CD3 $\gamma$  (**Figura 29**). En paralelo, analizamos la fosforilación de las isoformas (42-44Kd) fosforiladas de la proteína ERK (proteína serina-treonina quinasas) sobre la misma membrana, siendo la fosforilación completamente normal para ambas isoformas.

La fosforilación de tirosinas, detectada con un anticuerpo fosfo-específico (clon 4G10), fue cuantificada con respecto a la cantidad de proteína total, detectada con anticuerpos  $\alpha$ -tubulina (clon B.1.5.2) o bien con el anticuerpo ERK total (Clon 3A7)(**Figura 29**). El *ratio* de densidad óptica (O.D) de las proteínas fosforiladas con respecto a la cantidad de proteína total, expresado en unidades arbitrarias, mostró una fosforilación reducida para dicho rango de proteínas en ausencia parcial o total de CD3 $\gamma$ . La detección de este amplio rango de proteínas con una fosforilación en tirosinas defectuosa en respuesta a pervanadato, y no implicadas de forma directa en la señalización del complejo TCR/CD3, en ausencia parcial (heterocigotos) o total (deficientes) de CD3 $\gamma$ , nos sugiere que en ausencia de CD3 $\gamma$ , a pesar de que la mayoría de respuestas vía TCR/CD3 son normales, no se excluye *a priori* la posibilidad de que otras rutas pudieran estar afectadas.

Estos resultados sugieren que la cantidad de proteína fosforilada es inversamente proporcional a la dosis génica de las células analizadas. El pervanadato aumentaría la fosforilación al máximo en cada tipo celular, de este modo nos indicaría indirectamente la cantidad de proteína fosforilada total, la cual podría estar vinculada con la cantidad de complejo TCR/CD3 expresado en membrana.



**Figura 29. (A) Fosforilación de tirosinas en respuesta a pervanadato (PV) durante 5 minutos en células T control ( $\gamma^{+/+}$ ) heterocitoto ( $\gamma^{+/-}$ ) y deficiente ( $\gamma^{-/-}$ ) transformadas con HVS. Los resultados obtenidos muestran una fosforilación normal de ERK y una fosforilación defectuosa en tirosinas en células T heterocigotos y deficientes en comparación con las células T control. La fosforilación fue detectada con el empleo de anticuerpos fosfo-específicos como pERK (Clon E4), p-Tyr (Clon 4G10) y TCR $\zeta$  (6B10.2). El control de carga fue determinado con un anticuerpo específico anti- $\alpha$ -tubulina (B.5.1.2). (B) Cuantificación mediante densitometría de bandas de la fosforilación de tirosinas en respuesta a pervanadato en células T control ( $\gamma^{+/+}$ ) heterocitoto ( $\gamma^{+/-}$ ) y deficiente ( $\gamma^{-/-}$ ) transformadas con HVS. La señal obtenida se cuantificó en unidades arbitrarias de densitometrías y se representó como el incremento de activación en comparación con la carga.**

Por tanto, estos hallazgos junto con los resultados previamente observados (**Torres PS et al, 2002**) en nuestro laboratorio nos indujeron a investigar detenidamente algunas de las proteínas directamente vinculadas con la activación del TCR y que presentan un peso similar a las observadas, con el objeto de confirmar si alguna de ellas podría tener una fosforilación defectuosa en respuesta a la activación del complejo TCR/CD3.

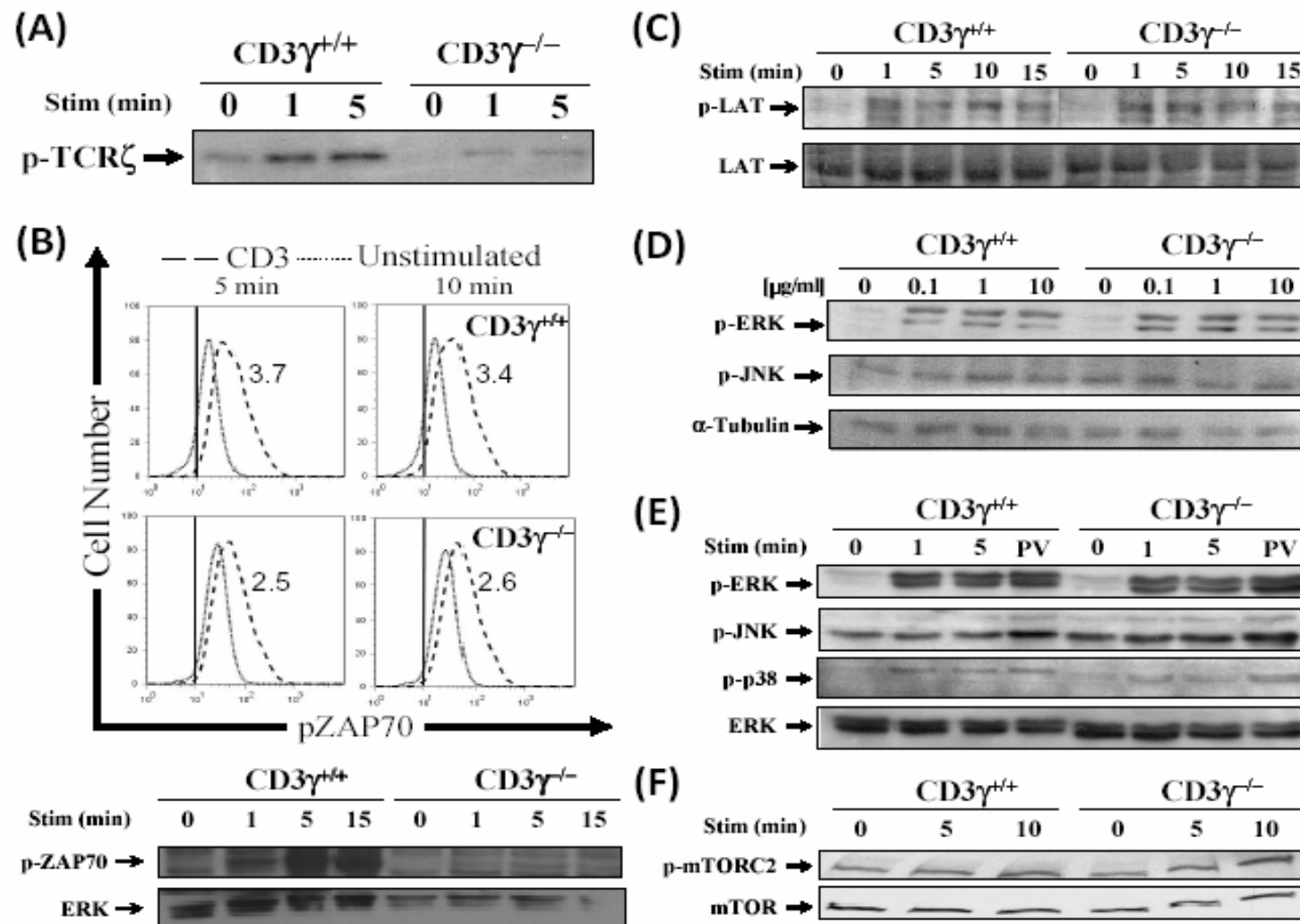


Figura 30. Figura resumen de las principales rutas de señalización intracelular analizadas en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$  en linfocitos T transformados con HVS.

### 1.3. Linfocitos Primarios.

#### 1.3.1. Función de las iNKT en respuesta a $\alpha$ -galactosil-ceramida normal.

Las células iNKT en humanos constituyen una subpoblación minoritaria de células T con propiedades únicas como un TCR invariante caracterizado fenotípicamente como TCR V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup>. La estimulación antígeno-específica *in vitro* de las células iNKT se produce a través del reconocimiento de un antígeno sintético conocido  $\alpha$ -Galactosil-Ceramida ( $\alpha$ -GalCer), obtenido a partir de una esponja marina “*Agelas mauritanus*”, que permite la expansión específica de este subgrupo de células T (Chiba A et al 2009, Croudace JE et al 2008, Moreno M et al 2008, Kawano T et al, 1997). Básicamente, la  $\alpha$ -GalCer es un hidrato de carbono unido a una ceramida, donde la molécula CD1d se une al fragmento de ceramida, quedando el azúcar hidrofílico expuesto para su unión con el TCR (Figura 1).

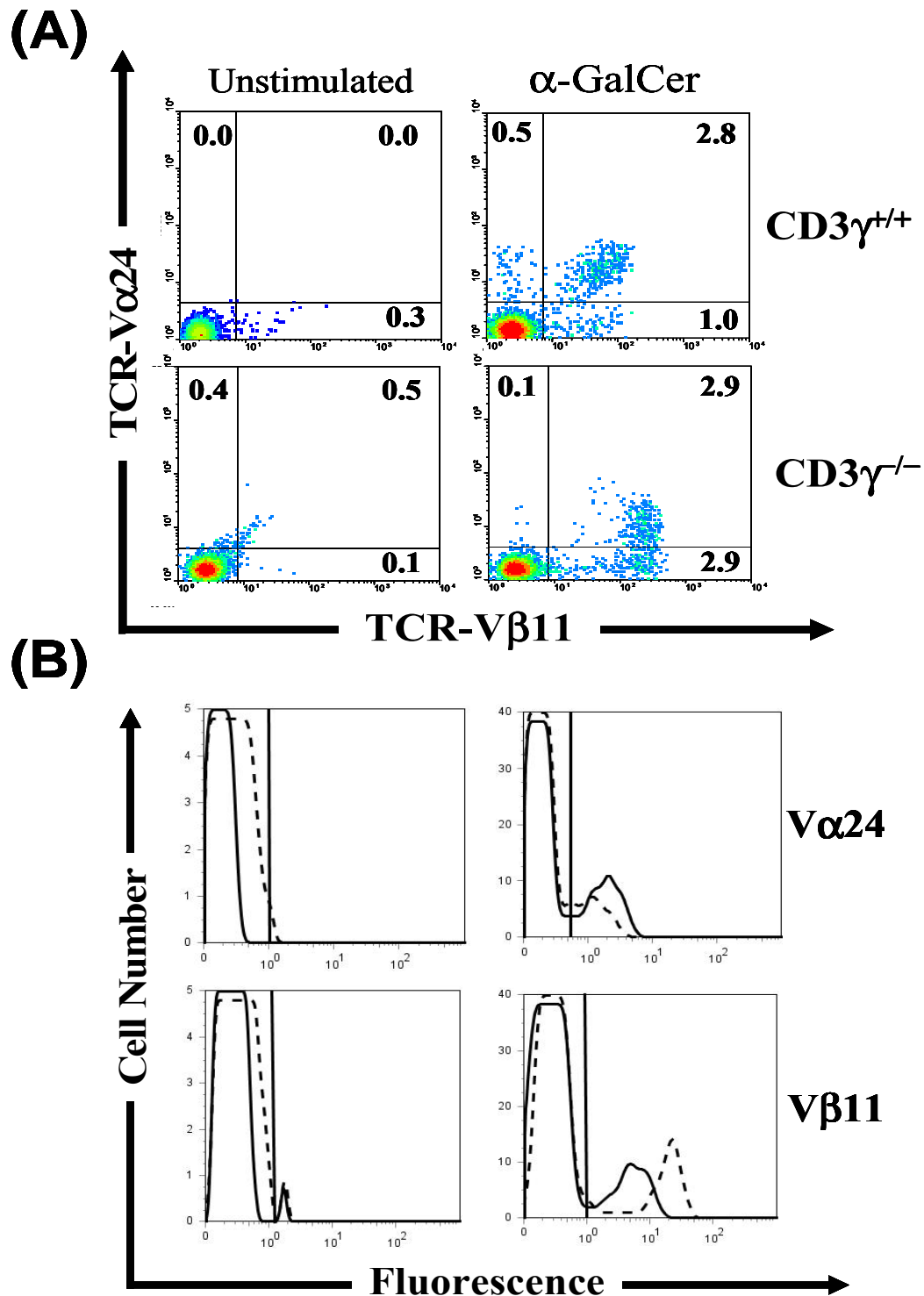
Con el objeto de examinar posibles defectos en la señalización antígeno-específica del complejo TCR invariante de las células iNKT en ausencia de CD3 $\gamma$ , se realizó una estimulación antígeno-específica en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de un donante sano y un deficiente en CD3 $\gamma$ . Para ello se empleo la  $\alpha$ -GalCer a una concentración de 100ng/ml con rhIL-2 (100UI/ml) durante 11 días. Transcurrido ese intervalo de tiempo, se comparó la expresión del TCR V $\alpha$ 24<sup>+</sup>V $\beta$ 11<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. Se observó que el porcentaje de células iNKT fue similar ( $\approx$ 3%) en células iNKT control y deficientes en CD3 $\gamma$ , lo cual nos indica que la proliferación de las células iNKT, en ausencia de CD3 $\gamma$ , es completamente normal en respuesta a la estimulación antígeno específica (Figura 31).

Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente en ensayos de proliferación con  $\alpha$ -GalCer en células iNKT procedentes de ratones transgénicos para TCR $\zeta$ , en los que se detecto una respuesta proliferativa limitada con un gran porcentaje de células bloqueadas en el primer y segundo ciclo de división celular (Becker AM et al, 2010). Estas diferencias podrían estar debidas a la propia señalización/función diferencial de las cadenas CD3 o bien debido a los distintos roles de las cadenas CD3 entre humanos y ratones (Malissen B et al, 1999).

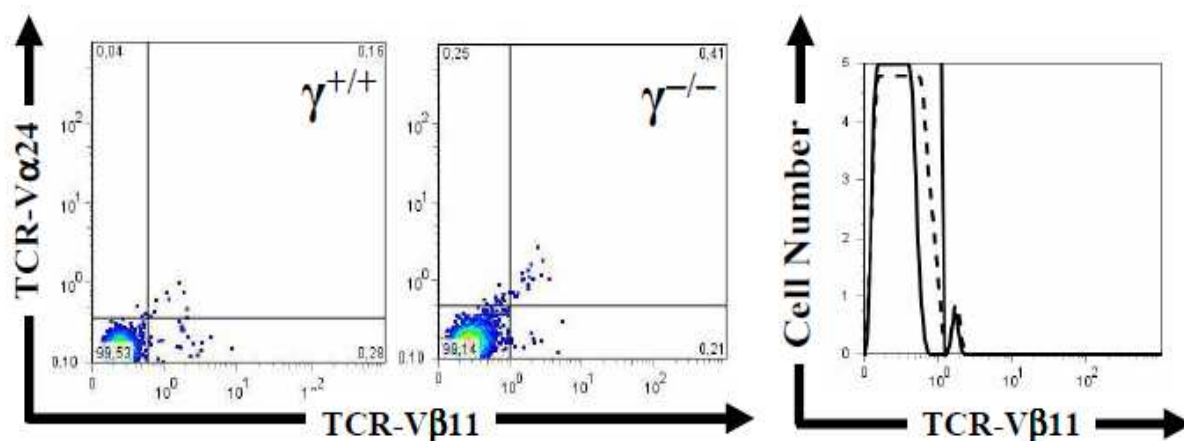


En paralelo, se observó que las células iNKT que carecían de la cadena CD3 $\gamma$  mostraban una tinción diferencial en la expresión de su TCR invariante transcurridos 11 días de estimulación. En concreto, presentaban una mayor expresión del TCR V $\beta$ 11<sup>+</sup> (*fold* >3) en comparación con las células iNKT control procedentes de individuos sanos. Sin embargo, la expresión del TCR V $\alpha$ 24<sup>+</sup> fue similar en células iNKT control y deficientes en CD3 $\gamma$  al cabo de 11 días (**Figura 31**). Estas diferencias de tinción no se observaron al inicio de la estimulación con  $\alpha$ -GalCer (**Figura 32**).

Este resultado nos podría sugerir un papel relevante de la cadena CD3 $\gamma$  en la topología final del complejo TCR en células iNKT pero sin repercusión en la funcionalidad. Sin embargo, estos resultados también podrían deberse a un mecanismo de compensación de dichas células, al ser seleccionadas preferentemente, tras la estimulación con  $\alpha$ -GalCer en base a los resultados obtenidos de la proliferación al cabo de 11 días.



**Figura 31.** Las células iNKT  $\gamma^{-/-}$  muestran una respuesta normal a la  $\alpha$ -galactosil-ceramida y niveles más alto de expresión de V $\beta$ 11 (A) Células de sangre periférica de un donante deficiente en CD3 $\gamma$  y de un donante sano se cultivaron durante 11 días en presencia de 50 IU/ml de rhIL-2 y 100 ng/ml de  $\alpha$ -galactosil-ceramida ( $\alpha$ -GalCer) y se tiñeron como indicado. El número de cada histograma indica el porcentaje de células. (B) Expresión comparativa de V $\alpha$ 24 y V $\beta$ 11 entre células de humanos deficientes en CD3 $\gamma$  (línea discontinua) y células iNKT control (línea continua) tras estimulación con  $\alpha$ -GalCer.



**Figura 32. Patrones de reactividad de la expresión de TCRV $\beta$ 11 tras la estimulación con  $\alpha$ -GalCer en el día 1.** No se observaron diferencias tras la estimulación con  $\alpha$ -GalCer (izquierda). Histogramas representativos de la expresión de TCRV $\beta$ 11 en células T deficientes en CD3 $\gamma$  en comparación con células T control (derecha).

## 2. Fenotipo y función en la deficiencia adquirida (KD) para CD3 $\gamma$ o CD3 $\delta$ .

En humanos la falta congénita de las cadenas CD3 causa un grupo de inmunodeficiencias caracterizadas por una severa linfopenia selectiva del linaje T, asociada a un grave defecto de expresión del complejo TCR/CD3, que en el caso de CD3 $\gamma$  pero no de CD3 $\delta$ , permite cierto grado de selección y expansión periférica de los linfocitos T (**Pacheco-Castro A et al, 1998; Recio MJ et al, 2007; Siegers GM et al, 2007**). Por tanto es difícil abordar el papel biológico de CD3 $\delta$  en linfocitos T maduros. A pesar del elevado grado de homología que comparten ambas cadenas CD3 ( $\gamma$  y  $\delta$ ), sólo CD3 $\delta$  muestra una función no redundante en el comienzo del desarrollo de las células T en humanos, como lo demuestra el hallazgo de que en ausencia de CD3 $\delta$ , pero no CD3 $\gamma$ , se carece completamente de linfocitos T en sangre periférica (**Dadi HK et al, 2003; de Saint-Basile G et al, 2004**). Sin embargo, se desconoce si la contribución de la cadena CD3 $\delta$  en el desarrollo de los linfocitos T es funcional o estructural. Con el objeto de abordar el papel de CD3 $\delta$ , nos hemos propuesto analizar el efecto de su deficiencia adquirida mediante interferencia (*Knock-Down*) en linfocitos T maduros en comparación con los mutantes naturales de CD3 $\gamma$ .

### 2.1. *Knock-down* específico.

Una de las dificultades técnicas de llevar a cabo este estudio mediante *Knock-Down* (KD) se encuentra en los propios linfocitos puesto que son células resistentes a la transfección lipídica (**Mantei A et al, 2008; Yin et al, 2006; McManus MT et al, 2002**), lo que dificulta la incorporación de oligos.

Estudios previos mediante el empleo de siRNA y electroporación, el silenciamiento de la expresión de determinados receptores de membrana en linfocitos T (**McManus MT et al, 2002; Chang SM et al, 2006; Ho HY et al, 2006**). Pero hasta el momento, no se ha realizado silenciamiento mediante siRNA de complejos multiméricos en membrana tan complejos como el receptor TCR/CD3. El grado de eficiencia de la incorporación de los oligos mediante electroporación representa una dificultad, para solucionarlo y así monitorizar la cantidad de siRNA introducida en las células T, hemos empleado un siRNA trazador (siGLOred, véase material y métodos).

Este siRNA trazador carece de funcionalidad inhibitoria y se encuentra conjugado con un fluorocromo. El empleo de este oligo permite optimizar las condiciones de la técnica y monitorizar la eficiencia de la electroporación (**Figura 16A**). El grado de eficiencia esperado, en igualdad de condiciones, para la electroporación de los siRNA específicos debe ser idéntico al obtenido para el siRNA trazador (siGLORed). La mejor detección de la señal emitida por el fluoróforo se encuentra estimada alrededor de las 24 horas.

Los linfocitos T Jurkat ( $\alpha\beta$ TCR)<sup>+</sup> fueron electroporados con un *pool* de oligos siRNA específicos dirigidos hacia las cadenas CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  (**Figura 16B**). Como controles del silenciamiento específico se han incluido los siguientes controles de electroporación: 1) Células electroporadas pero no tratadas (*mock electroporation*) 2) Células electroporadas y tratadas con un siRNA irrelevante no dirigido hacia los RNAm diana (*siRNA Non-target*) 3) Y finalmente células electroporadas y tratadas con siRNA dirigido hacia la enzima GAPDH (Gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa).

El análisis del *Knock-Down* (KD) de la cadena CD3 $\gamma$  fue llevado a cabo mediante citometría de flujo intracelular 24 horas tras la electroporación. La expresión de CD3 $\gamma$  fue detectada con el antisuero TG5 (véase material y métodos) previamente empleado en nuestro laboratorio (**Pacheco-Castro A et al, 1998**), y que reconoce el tallo intracitoplasmático de la cadena CD3 $\gamma$ . Para la validación de la expresión de CD3 $\gamma$ , utilizamos la línea celular JGN (*Jurkat gamma negative*) y linfocitos B transformados (EBV) que carecen de la cadena CD3 $\gamma$  como controles negativos de expresión. En paralelo, se analizó intracelularmente la expresión de otras cadenas CD3 (CD3 $\epsilon$  y CD3 $\zeta$ ) así como otras moléculas control como CD4 mediante el empleo de anticuerpos específicos (clones SP-34, 6B10.2 y Leu3a respectivamente) en las células silenciadas (**Figura 33A**).

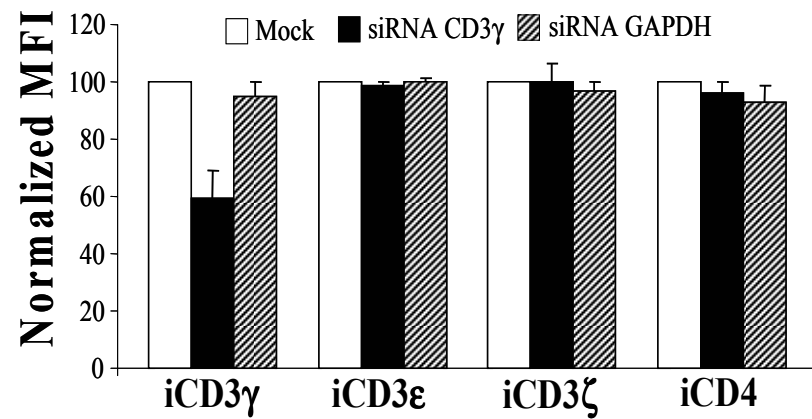
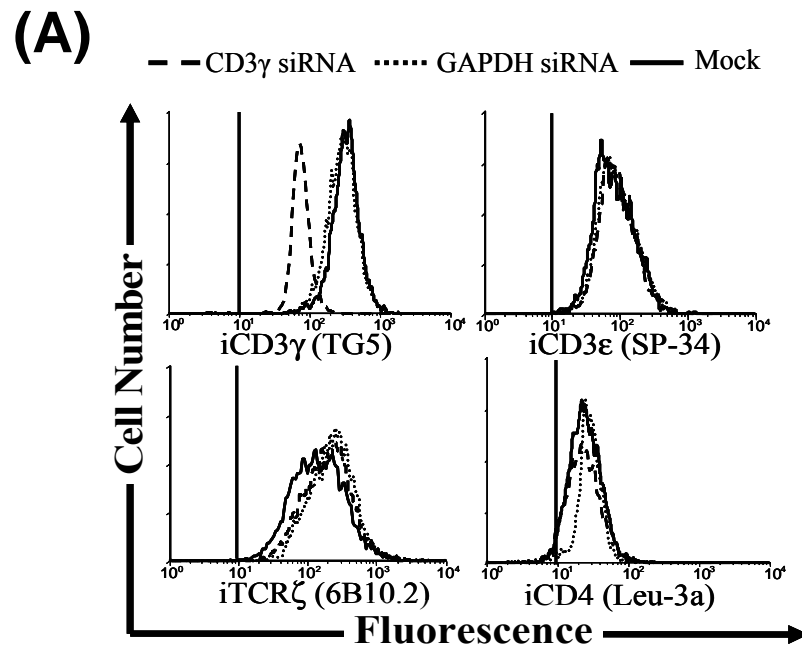
Nuestros resultados indican que tras el KD de CD3 $\gamma$ , las células mostraban una reducción significativa de la cadena CD3 $\gamma$  en comparación con con las células T control electroporadas pero no silenciadas (*mock electroporation*) y con las células silenciadas con el KD de GAPDH transcurridas 24 horas de la electroporación (**Figura 33A**). Paralelamente, la expresión de las cadenas CD3 (CD3 $\epsilon$  y TCR $\zeta$ ) y CD4 no se encontraron afectadas tras el

silenciamiento específico de CD3 $\gamma$ . Todos estos resultados fueron similares en al menos seis experimentos independientes (**Figura 33B**).

Paralelamente, se analizó el *Knock-Down* (KD) de la cadena CD3 $\delta$  mediante western-blot con un anticuerpo específico (clon APA1/2) 24 horas tras la electroporación. Para ello, se obtuvo un lisado completo de las células silenciadas (véase material y métodos), y se analizó la cantidad de proteína correspondiente a la cadena CD3 $\delta$  que compone el complejo TCR/CD3. Como controles del silenciamiento específico, se emplearon los descritos previamente en el KD de CD3 $\gamma$ , y además como control negativo de la expresión de las cadenas CD3 se emplearon lisados procedentes de linfocitos B transformados (EBV).

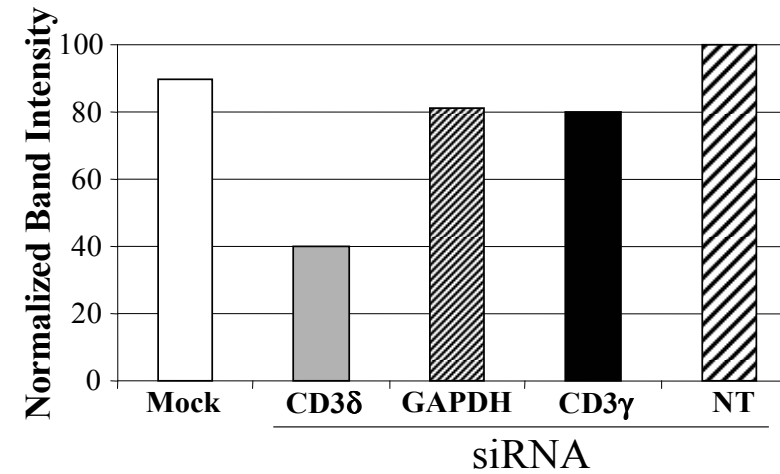
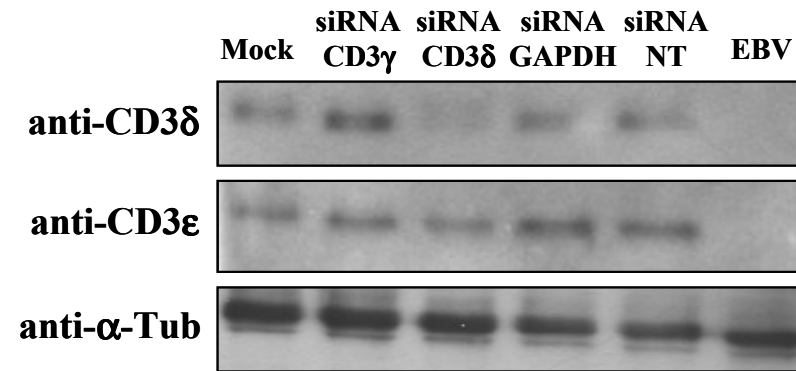
Nuestros resultados mostraron una reducción selectiva y significativa de la cadena CD3 $\delta$  tras el silenciamiento transitorio en comparación con las células T control electroporadas pero no silenciadas (mock electroporation) y con las células silenciadas con el KD de GAPDH 24 horas tras la electroporación (**Figura 34**).

La cuantificación de la proteína CD3 $\delta$  tras el silenciamiento transitorio fue llevada a cabo mediante densitometría de bandas entre la cantidad de proteína CD3 $\delta$  en comparación con la cantidad de proteína total detectada con anticuerpos dirigidos hacia la cadena CD3 $\epsilon$  (Clon M20) y hacia la proteína  $\alpha$ -tubulina (Clon B.1.5.2). Estos resultados confirmaban la reducción específica de la cadena CD3 $\delta$  tras el silenciamiento transitorio (**Figura 34**).



**(B)**

### siRNA 24h treatment



**Figura 33. Silenciamiento de la expresión del KD de CD3 $\gamma$  en linfocitos T Jurkat.** Histogramas representativos mostrando la reducción de la expresión de CD3 $\gamma$  al cabo de 24 horas de electroporación con el empleo de un suero intracelular específico para CD3 $\gamma$  (TG5). Como control negativo de expresión de las cadenas CD3 se han empleado linfocitos B transformados (EBV) y JGN (linfocitos T Jurkat carentes de CD3 $\gamma$ ), respectivamente. No se observaron diferencias de expresión para CD3 $\epsilon$  (SP-34), CD3 $\zeta$  (6B10.2) y CD4 (Leu-3a) después del tratamiento. La línea continua indica el control de electroporación (*mock*), la línea discontinua indica las células tratadas con CD3 $\gamma$  siRNA y la línea punteada indica las células tratadas para GAPDH siRNA. Los resultados son representativos de al menos 6 experimentos (arriba).

**Figura 34. Silenciamiento de la expresión de CD3 $\delta$  con siRNA específicos en linfocitos T Jurkat.** El silenciamiento de CD3 $\delta$  fue determinado mediante Western-blot a partir de lisados celulares totales después de 24 horas post-electroporación con un anticuerpo monoclonal específico anti-CD3 $\delta$  (APA1/2). Como control negativo de expresión de CD3 se ha empleado linfocitos B transformados (EBV) (izquierda). El control de carga de proteína fue determinado mediante inmunoblotting con anticuerpos monoclonales específicos anti-CD3 $\epsilon$  (M-20) y anti- $\alpha$ -tubulina (B-5-1-2). La cuantificación de proteína mediante densitometría de bandas de CD3 $\delta$  respecto CD3 $\epsilon$ / $\alpha$ -tubulina, tratadas con CD3 $\delta$  siRNA, mostró una reducción específica de la proteína CD3 $\delta$  a las 24 horas post-electroporación (derecha).

## 2.2. Papel diferencial de las cadenas CD3 $\gamma$ y CD3 $\delta$ en la expresión y topología del complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 en superficie.

Una vez hemos confirmado el silenciamiento de la cadena CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  mediante KD (deficientes adquiridos) en los linfocitos T Jurkat ( $\alpha\beta$ TCR) (**Figuras 33 y 34**), nos propusimos analizar la expresión del complejo TCR/CD3 en superficie y evaluar el impacto del silenciamiento de las cadenas CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  en los linfocitos T maduros. Para ello, hemos monitorizado la expresión del complejo TCR/CD3 con una amplia batería de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el complejo TCR/CD3 (véase material y métodos). El máximo grado de silenciamiento del complejo TCR/CD3 en superficie fue alcanzado entre las 24 y 48 horas. No se consideraron tiempos posteriores debido a la reducida viabilidad de las células silenciadas tras la electroporación.

En el silenciamiento de la cadena CD3 $\delta$ , observamos una reducción de la expresión del complejo TCR/CD3. La pérdida de la expresión fue monitorizada mediante el empleo de diferentes anticuerpos monoclonales para los tiempos indicados (**Figuras 35 y 36**), y sugiere un defecto de expresión cuantitativo. La molécula control empleada fue CD4 (Clon Leu3a), tanto para el KD de CD3 $\delta$  como CD3 $\gamma$ , siendo su expresión constante en todos los casos. De acuerdo con estos resultados, la cadena CD3 $\delta$  ejerce un papel estructural crítico y no redundante en la expresión y el ensamblaje del complejo receptor TCR, dado que su falta adquirida (mediante KD) da lugar a una disminución equivalente del número de receptores en



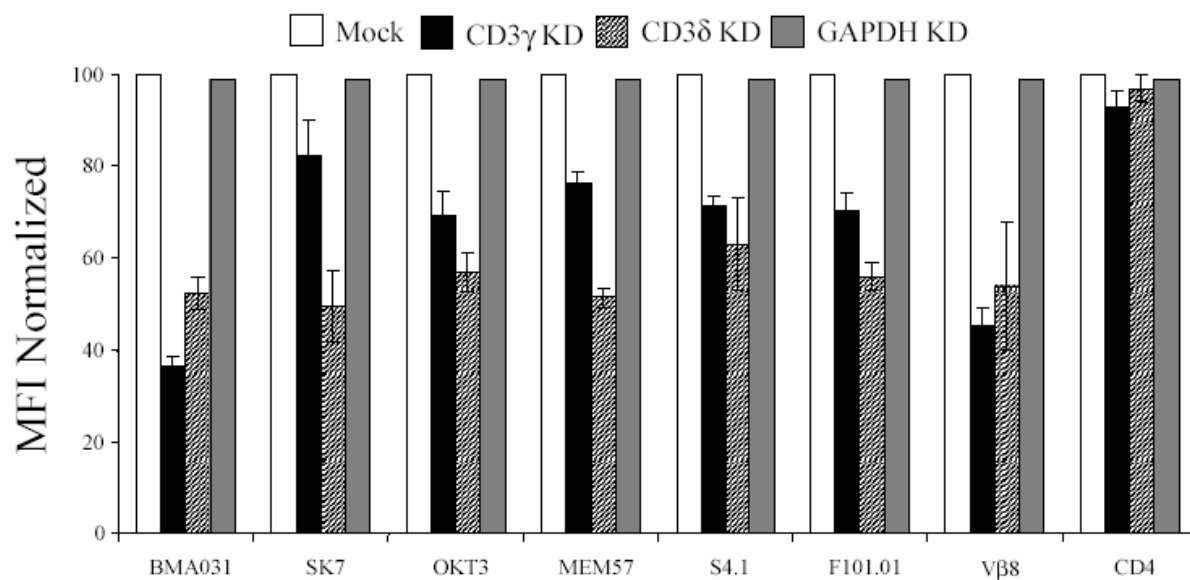
superficie sin que ninguna otra cadena la reemplaze y recapitule la expresión del complejo TCR/CD3.

En el silenciamiento de CD3 $\gamma$ , también observamos una reducción de la expresión del complejo TCR/CD3. Sin embargo, dicha pérdida de expresión fue detectada de forma diferencial según los anticuerpos monoclonales empleados para los tiempos indicados (**Figuras 35 y 36**). En concreto, la expresión del complejo TCR/CD3 se encontraba más afectada por algunos anticuerpos, más dependientes de CD3 $\gamma$  como el BMA031, que por otros menos dependientes como el SK7. La reducción severa y selectiva de la expresión del epítipo reconocido por el anticuerpo BMA031 ha sido descrita previamente en los mutantes naturales (**Pérez-Aciego P et al, 1991**). Por tanto, nuestros resultados confirman que la cadena CD3 $\gamma$  es necesaria para la exposición de este epítipo, y debe desempeñar un papel cualitativo en la expresión y topología del complejo dado que su ausencia parcial es monitorizada de forma diferencial por los anticuerpos monoclonales.

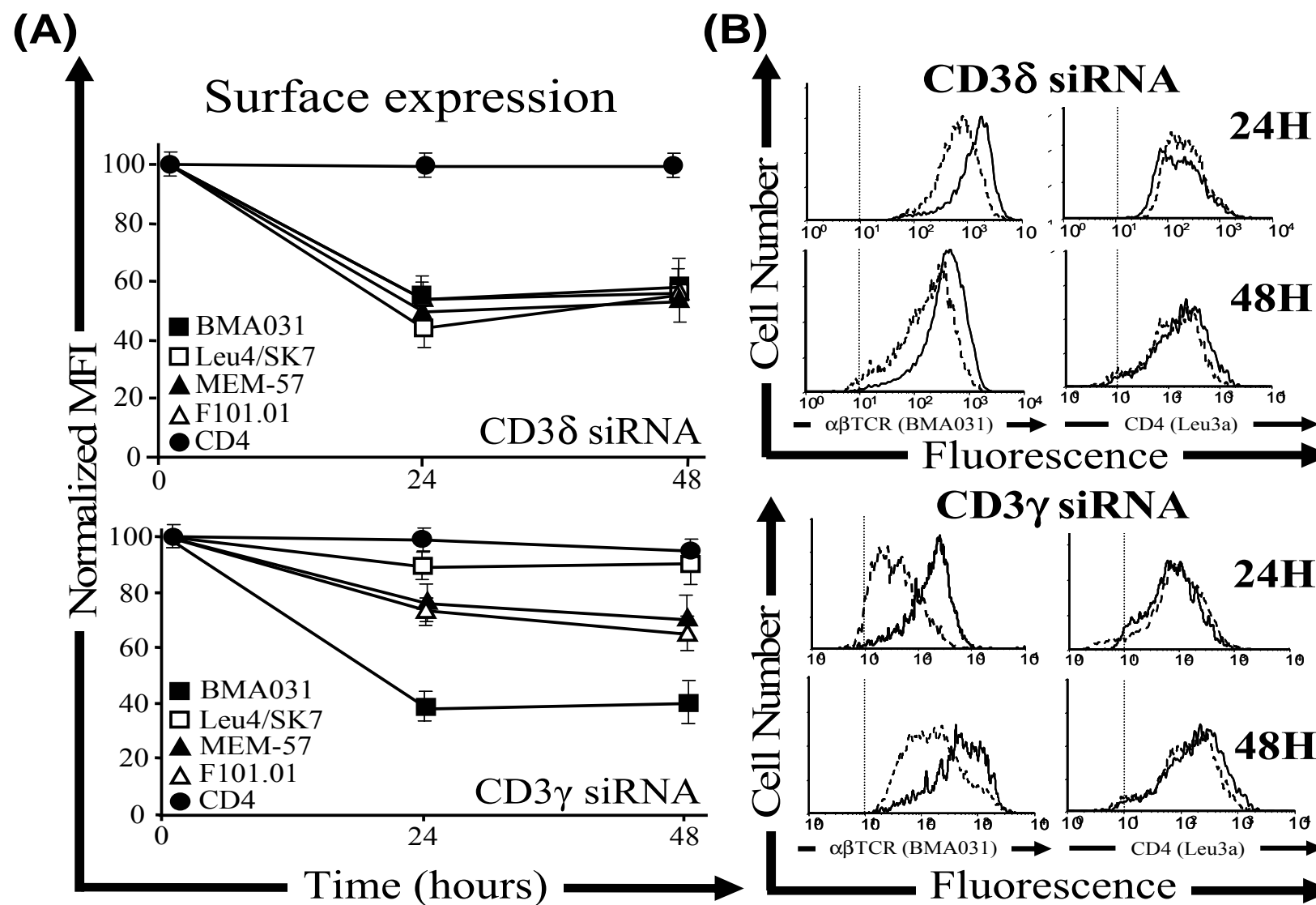
En conjunto, estas diferencias sugieren que las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  ejercen papeles distintos en el ensamblaje, la expresión y la topología del complejo TCR/CD3 en los linfocitos T maduros, que podrían ser los causantes de los efectos dispares observados en la expresión del complejo TCR/CD3. Basándonos en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los anticuerpos empleados en el análisis, podemos establecer una jerarquía de mayor a menor dependencia para una u otra cadena. En el caso de la cadena CD3 $\delta$ , se produce una reducción equivalente de la expresión del complejo TCR/CD3 para todos los anticuerpos analizados (**Figuras 35, 36**). Esto sugiere que la cadena CD3 $\delta$  proporciona una mayor estabilidad ( $\delta \gg \gamma$ ) en el complejo TCR/CD3 puesto que su ausencia parcial tras el silenciamiento (KD) da lugar a una caída similar en el número de receptores en superficie, y ninguna otra cadena invariante puede reemplazar su lugar.

No sucede así con la cadena CD3 $\gamma$  puesto que su ausencia podría ser suplantada por CD3 $\delta$  que permite la expresión aunque con una estequiometría aberrante y mala asociación a TCR $\zeta$  (**Zapata DA et al 1999, 2004**). De acuerdo con los resultados obtenidos, la jerarquía de mayor a menor dependencia para la cadena CD3 $\gamma$  para los distintos anticuerpos empleados sería la siguiente: BMA031>Vb8>OKT3 $\geq$ F101.01 $\geq$ S4.1>MEM57>SK7 (**Figura 35**). El argumento cualitativo basado en la suplantación de una cadena por otra podría explicar la

disparidad en la expresión de algunos anticuerpos que son más dependientes que otros de la cadena CD3 $\gamma$ .



**Figura 35.** Diagramas normalizados de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para una amplia batería de anticuerpos tras el *knock-down* de las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  transcurridas 48 horas.



**Figura 36. Silenciamiento de la expresión de las cadenas CD3 $\delta$  y CD3 $\gamma$  al cabo de 24-48 horas post-electroporación.** Expresión del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 en función del tiempo para diferentes anticuerpos monoclonales (izquierda). Histogramas representativos de BMA031 y CD4 en células tratadas con CD3 $\delta$  ó CD3 $\gamma$  siRNA a 24 y 48 horas del tratamiento (derecha). **Efectos diferenciales en el reconocimiento epitópico del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 tras el silenciamiento con siRNA.** Expresión del complejo  $\alpha\beta$ TCR/CD3 tras el silenciamiento de CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$ . Las células T Jurkat fueron electroporadas con siRNAs y cultivadas durante 3 días. Posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo con un amplio rango de anticuerpos (anti- $\alpha\beta$ TCR (BMA031); anti-CD3 (Leu4/SK7); anti-CD3 (Leu4/SK7); anti-CD3(MEM-57); anti-CD3 (F101.01) y anti-CD4 (Leu-3a). Histogramas representativos de la expresión de  $\alpha\beta$ TCR y CD4 (clon en paréntesis) en células tratadas con siRNA transcurridas 24 a 72 horas tras la electroporación. La línea continua indican las células tratadas con el KD de GAPDH y la línea discontinua indican las células tratadas con el KD de CD3 $\gamma$  (arriba) o CD3 $\delta$  (abajo).

## 2.3. Análisis funcional.

### 2.3.1. Defecto selectivo de internalización del complejo TCR/CD3 inducido por PMA en las células silenciadas para CD3 $\gamma$ .

Estudios previos han demostrado que el TCR (y pre-TCR) pueden ser funcionales en humanos sin la cadena CD3 $\gamma$ , pero no sin la cadena CD3 $\delta$  o CD3 $\epsilon$  (Haks MC et al, 1998, 2001; Dave VP et al, 1997; Recio MJ et al, 2007). Con el fin de conocer si las señales propagadas por los complejos TCR/CD3 silenciados eran normales o defectuosas para las respuestas funcionales, nos propusimos analizar diferentes parámetros funcionales como la internalización del complejo TCR/CD3 mediada por PMA, la inducción del flujo Ca<sup>2+</sup> y la expresión de marcadores de activación, en las células silenciadas CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  y comparar dichas respuestas con los deficientes naturales.

Uno de los parámetros analizados en las células silenciadas fue la internalización del complejo TCR/CD3 mediada por ésteres de forbol (PMA). La PMA internaliza el complejo TCR/CD3 debido a que reconoce unos motivos de di-leucina que se encuentran únicamente presentes en la cadena CD3 $\gamma$  a nivel intracelular (Boding L et al, 2009; von Essen M et al, 2002). De hecho, los mutantes naturales (deficientes congénitos de CD3 $\gamma$ ) son incapaces de internalizar el complejo TCR/CD3 al carecer completamente de la cadena CD3 $\gamma$  (Torres PS et al, 2002). En este contexto, podemos analizar el grado de modulación del complejo TCR/CD3 en función del nivel de silenciamiento ejercido por el KD de CD3 $\gamma$ .

Por tanto, se analizó la modulación del complejo TCR/CD3 mediada por PMA, en presencia y ausencia de dicho estímulo a una concentración de 20ng/mL durante 30 minutos a

37° C como se ha descrito previamente (Torres PS et al, 2002). El tratamiento experimental se realizó en células electroporadas pero no tratadas (*mock electroporation*) y células tratadas con el KD para CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  y GAPDH.

La internalización del complejo TCR/CD3 en células tratadas con el KD de CD3 $\gamma$  fue similar a la observada en las células transformadas HVS de individuos deficientes totales para la cadena CD3 $\gamma$  (Figura 37). Por el contrario, las células tratadas con el KD para CD3 $\delta$  fueron capaces de internalizar el complejo TCR/CD3 de forma similar a los controles.

### 2.3.2. Defecto en la inducción del flujo de Ca<sup>2+</sup> en las células silenciadas para CD3 $\delta$ .

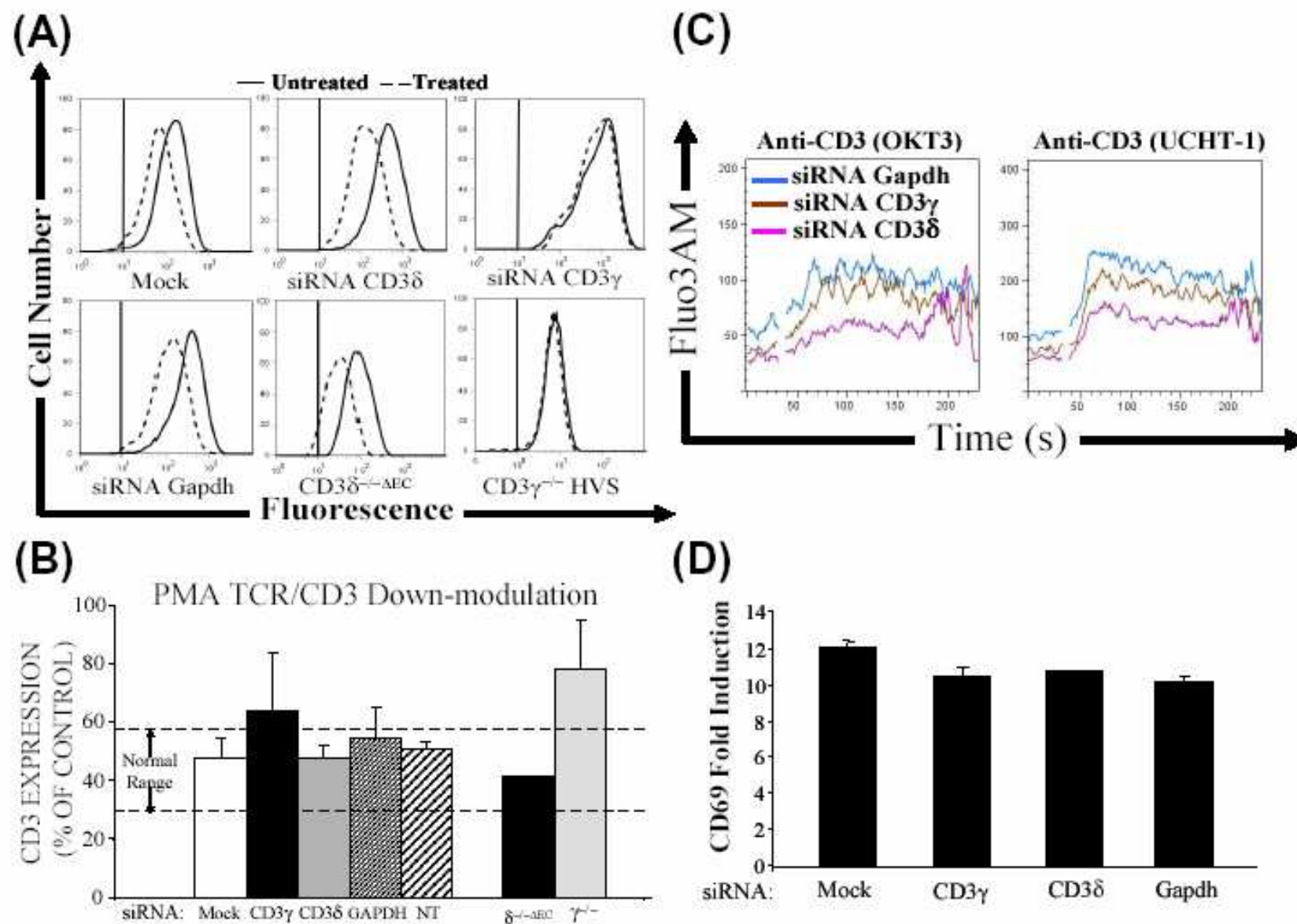
Uno de los principales eventos funcionales que se producen tras la activación del complejo TCR/CD3 es la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular. De hecho, una inducción del flujo de Ca<sup>2+</sup> baja o nula conlleva defectos severos en la señalización intracelular de los linfocitos T. Con el fin de conocer la capacidad funcional de las células silenciadas, nos propusimos analizar la movilización de calcio tras su estimulación en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (Figura 37). El análisis de la liberación de calcio al citoplasma se realizó mediante citometría de flujo utilizando el Fluo3AM, una molécula que emite fluorescencia al unirse al calcio liberado en el citoplasma celular (Torres PS et al, 2003).

Nuestros resultados en el KD de CD3 $\delta$  mostraron una inducción del flujo de calcio, en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1), menor en comparación con las células silenciadas con GAPDH. No sucede así en las células silenciadas con el KD de CD3 $\gamma$  que se encontraban levemente afectadas en comparación con las células silenciadas con el KD de GAPDH (Figura 37). Estos resultados fueron similares en respuesta a otros anticuerpos anti-CD3 (OKT3) (Figura 37). Nuestros resultados sugieren que la ausencia parcial (KD) de CD3 $\delta$ , a diferencia de CD3 $\gamma$ , afecta severamente a la capacidad funcional de los linfocitos T maduros, y por tanto CD3 $\delta$  debe ejercer un papel no redundante en la activación de las células T.

### 2.3.3. Inducción de CD69 normal en las células silenciadas.

Por último, otro de los eventos funcionales analizados en las células silenciadas fue la inducción de marcadores de activación como CD69 mediante el empleo de anticuerpos específicos (clon L78) en citometría de flujo extracelular. La molécula CD69 no se detecta en linfocitos T en reposo y aparece en superficie al cabo de 2-3 horas del estímulo. La máxima expresión se alcanza a las 24 horas, luego va desapareciendo gradualmente hasta las 72 horas cuando ya no es detectable en la superficie celular. Datos previos de nuestro laboratorio, indican que la inducción de CD69 es completamente normal en respuesta a anticuerpos anti-CD3 en los mutantes naturales deficientes en CD3 $\gamma$  (**Pacheco-Castro A et al, 1998**). Por el contrario, en la nueva deficiencia *leaky* descrita para CD3 $\delta$  la inducción de CD69 es defectuosa (**Gil J et al, 2011**). De igual modo, sucede en ratones deficientes para CD3 $\delta$  donde la inducción de CD69 es también defectuosa (**Delgado P et al, 2000**).

En este contexto, nos propusimos analizar la inducción del marcador temprano de activación CD69 en células silenciadas, la estimulación de las células silenciadas fue llevada a cabo en respuesta a anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1), y como control positivo de activación se ha empleado un mitógeno celular, la fitohemaglutinina (PHA), tal y como se ha descrito previamente (**Craston R et al, 1997; Rutella S et al, 1999**). El tratamiento experimental se realizó en células electroporadas pero no tratadas (*mock electroporation*) y en células tratadas con el KD para CD3 $\gamma$  o CD3 $\delta$  y GAPDH. Nuestros resultados mostraron que las células silenciadas para CD3 $\gamma$  ó CD3 $\delta$  presentaban una inducción de CD69 normal (**Figura 37**).



**Figura 37. Análisis funcional del complejo TCR/CD3 en las células silenciadas para CD3 $\delta$  y CD3 $\gamma$ .** Histogramas comparativos que muestran la internalización defectuosa del complejo TCR/CD3 en linfocitos T Jurkat tratados con CD3 $\gamma$ siRNA pero normal en los linfocitos T tratados con CD3 $\delta$ siRNA. Estos resultados son similares a los obtenidos en líneas HVS o PBLs de individuos deficientes en CD3 $\gamma$ , y se encuentran en línea con los obtenidos en PBLs de individuos deficientes en CD3 $\delta$  (derecha). Los histogramas con línea discontinua indican las células sin tratar y los histogramas con línea continua corresponden a las células tratadas. Los resultados obtenidos son representativos de al menos 4 experimentos. Las células fueron incubadas en presencia y ausencia de 20ng/ml de PMA durante 30 min a 37° C, tras la estimulación fueron lavadas y teñidas con un anti-CD3 (Leu4/SK7) y analizadas mediante citometría de flujo como se ha descrito en material y métodos.





## 1. La deficiencia congénita o adquirida (*Knock-down*) de CD3 $\gamma$ no impide la señalización en linfocitos T maduros.

El estudio que abarca esta tesis se ha desarrollado con el propósito de conocer con detenimiento el papel que ejercen las cadenas CD3, esencialmente CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$ , en la expresión y función/señalización del complejo TCR/CD3. Los resultados de este trabajo en linfocitos T primarios y transformados carentes de CD3 $\gamma$  demuestran que dicha cadena no es imprescindible en la mayoría de las rutas de señalización analizadas como la fosforilación de algunos sustratos (ZAP70, LAT, ERK, mTORC2 y p38), la reorganización de la actina filamentosa y la expansión de las células iNKT. Sin embargo, sí se observaron defectos en la fosforilación de otros sustratos como TCR $\zeta$ , o en la defosforilación de NFAT. Estos hallazgos nos permitirán comprender la contribución específica de la cadena CD3 $\gamma$  durante el reconocimiento antigénico y a la transducción de señales.

### 1.1. ¿Cómo afecta la deficiencia congénita de CD3 $\gamma$ a la señalización tímica?

Uno de los viejos problemas en el estudio del papel biológico de cada cadena invariante del complejo TCR/CD3 (y del pre-TCR) es que si su papel estructural es crítico, no podremos conocer cuál es su contribución a la señalización por la sencilla razón de que no habrá complejo que analizar (**Figura 5**). De hecho, ese parece ser el caso de las deficiencias humanas para CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$  así como la ausencia de las cadenas CD3 $\epsilon$  o CD3 $\gamma$  en ratones, donde se observa un bloqueo completo en el desarrollo tímico de los linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$ . Por otra parte, las cadenas CD3 $\gamma$  y TCR $\zeta$  parecen ser cruciales en ratón, pero no en humanos, para la diferenciación de los linfocitos T $\alpha\beta$ . De hecho, en ratones deficientes en CD3 $\gamma$  no se han detectado linfocitos T maduros circulantes (en sangre periférica), aunque sí en sus órganos linfoides periféricos (**Haks MC et al, 1998**). Por el contrario, la cadena CD3 $\delta$  ejerce un papel más relevante en humanos ( $\delta \gg \gamma$ ) a diferencia de los modelos deficientes murinos ( $\gamma \gg \delta$ ) durante el desarrollo tímico de los linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$ . Por tanto, a pesar del elevado grado de homología que comparten ambas cadenas, CD3 $\delta$  y CD3 $\gamma$  ejercen funciones distintas en la señalización del complejo TCR/CD3 (y pre-TCR), y además su contribución es completamente diferente en humanos y ratones (**Figura 14**).

La deficiencia congénita de CD3 $\gamma$  causa en humanos una inmunodeficiencia del linaje T pero permite cierto grado de selección y desde luego la expansión periférica de linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  (**Pacheco-Castro A et al, 1998; Recio MJ et al, 2007; Siegers GM et al, 2007**) (**Figura 9**). Este hecho convierte la cadena CD3 $\gamma$  en el modelo de deficiencia de CD3 en humanos con una estequiometría aberrante ( $\alpha\beta/\delta\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ ) y una mala asociación del homodímero  $\zeta\zeta$  (**Zapata DA et al, 1999 y 2004**).

Durante el desarrollo tímico en ausencia de CD3 $\gamma$ , en humanos, la capacidad de exportación de linfocitos T maduros desde el timo a partir del número de células T vírgenes CD45RO<sup>+</sup> es considerablemente reducido en comparación con individuos sanos, tanto para el linaje celular T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (**Timón et al, 1993; Recio MJ et al, 2007**). Sin embargo, el número de linfocitos T y el repertorio TCR $\nu\beta$  de las células T memoria (CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>) era normal, y la subpoblación CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> detectada se encontraba próxima a la normalidad. Por tanto, la ausencia de CD3 $\gamma$  genera un defecto en la producción tímica, pero no en la expansión periférica o acumulación de células T maduras policlonales (**Timón et al, 1993; Recio MJ et al, 2007**).

Estos resultados sugieren que la cadena CD3 $\gamma$  debe ejercer un papel regulador en la selección tímica puesto que su ausencia pone de manifiesto un desarrollo tímico parcialmente comprometido con una reducción de los linfocitos emigrantes del timo. Pese a ello, un número reducido de estos emigrantes tímicos, llegados en periferia, son capaces de expandirse y acumularse como células T maduras. Por consiguiente, el bloqueo parcial de la selección tímica podría ser debido a una redundancia de funciones durante dicha selección por parte de las otras cadenas CD3.

En el modelo de ratón deficiente para la cadena CD3 $\gamma$ , se ha observado un severo bloqueo durante el desarrollo de ambos linajes de células T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  (**Haks MC et al, 1998**). El número de células detectado en el timo es inferior al 1% respecto a un ratón sano y la mayoría de timocitos detectados carecen de la expresión de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (DN). En concreto, el bloqueo en el desarrollo corresponde al estadio DN3 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> hacia a CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) de diferenciación a DP (dobles positivas), aunque la ausencia de la cadena CD3 $\gamma$  no afecta al reordenamiento de las cadenas TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ . Además, apenas se detectan células en sangre periférica y en órganos linfoides (inferior al 3%), lo que indica que tanto la selección

negativa como la selección positiva se encuentran seriamente alteradas en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$ . Finalmente, estos resultados sugieren que la cadena CD3 $\gamma$  debe emitir una señal específica en el pre-TCR que promueva la transición DN a DP, no pudiendo ser compensada por otra cadena CD3.

## 1.2. ¿Cómo afecta la deficiencia congénita de CD3 $\gamma$ a la señalización en los linfocitos T maduros?

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con células T humanas deficientes en CD3 $\gamma$  dependientes de IL-2 y transformadas con el virus *Herpesvirus saimiri* (HVS) indican que la cadena CD3 $\gamma$  contribuye, pero no es absolutamente necesaria, a la regulación del tráfico del receptor en células T en reposo y en células T activadas por ligando (**Torres PS et al, 2003**). A pesar de estos efectos en la expresión del receptor (reciclaje del complejo afectado), CD3 $\gamma$  no es imprescindible para diversas respuestas en linfocitos T maduros como el flujo de calcio, la citotoxicidad, la regulación de moléculas de superficie, la proliferación y la síntesis de citoquinas (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ). Por el contrario, la internalización del complejo mediada por PMA, la fosforilación temprana de algunos intermediarios de señalización (40,42,70 y 81kD), la inducción de la síntesis de otras citoquinas como la IL-2 a través del complejo TCR/CD3, la adhesión y la polarización se encontraban afectadas en células T humanas deficientes en CD3 $\gamma$  (**Pérez-Aciego P et al, 1991; Arnaiz-Villena A et al, 1992; Pacheco-Castro A et al, 1998; Torres PS et al, 2002**).

Estos trabajos apoyan la redundancia y especialización de la cadena CD3 $\gamma$  en el TCR/CD3 mutante para determinadas funciones en linfocitos T maduros. Pese a ello, no se conoce con exactitud la verdadera contribución de dicha cadena a la transmisión de señales, y cómo su ausencia podría explicar los defectos observados ni la normalidad de ciertas funciones. En nuestro laboratorio, nos planteamos algunas cuestiones como las siguientes: *¿Qué rutas de señalización intracelular son dependientes de CD3 $\gamma$ ? y ¿Por qué determinadas funciones no se encontraban afectadas en el TCR/CD3 mutante en la transmisión de señales?*. La respuesta a estas preguntas nos permitirá a su vez conocer el por qué de la supervivencia de dos de los cinco pacientes descritos en tres familias, para la inmunodeficiencia de CD3 $\gamma$ .

Nuestros primeros resultados han detectado un amplio rango de proteínas, en particular una de ellas próxima a los 20kD, la cadena TCR $\zeta$ , con una fosforilación defectuosa en tirosinas y proporcional a la cantidad de TCR/CD3 en superficie. Este hallazgo se apoya en un argumento más cuantitativo que cualitativo, en base a la señal emitida en respuesta a pervanadato, en ausencia parcial o total de la cadena CD3 $\gamma$  (**Figura 17**). El análisis de la fosforilación de esta proteína de 20kD, en respuesta a anticuerpos anti-CD3 nos reveló un defecto de fosforilación en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$  (**Figura 18**). Los reducidos niveles de fosforilación de la cadena TCR $\zeta$ , uno de los eventos intracelulares más tempranos, podrían ser explicados cuantitativamente en función de la cantidad de TCR/CD3 en superficie. Sin embargo, la fosforilación normal de eventos tardíos como ZAP70, LAT, MAPKs (ERK1/2 y p38) y mTORC2 a la señalización intracelular del complejo mutante excluyen el argumento cuantitativo.

Una de las posibles explicaciones a este hallazgo en células deficientes podría ser el reemplazo de la cadena CD3 $\gamma$  por CD3 $\delta$  en el TCR/CD3, y aunque este cambio aporta el motivo ITAM ausente, ni la estructura ni la función son normales puesto que la cadena CD3 $\delta$  no ocupa de forma adecuada el espacio dejado por CD3 $\gamma$  generando una estructura aberrante con mala asociación de CD3 $\zeta$  al TCR/CD3 mutante (**Zapata DA et al 1999, 2004**). De este modo, la fallida funcionalidad/señalización del complejo TCR mutante podría estar basada en un argumento estructural, es decir que como consecuencia del reemplazo de CD3 $\gamma$  por CD3 $\delta$  la estructura adoptada por el TCR/CD3 es menos eficiente en la transmisión de señales. Sin embargo este argumento no excluye el papel funcional específico de CD3 $\gamma$ , puesto que hay funciones que siguen siendo normales y otras son exclusivamente dependientes de esta cadena como la internalización del complejo mediada por PMA.

Los reducidos niveles de fosforilación de TCR $\zeta$  tras la activación del TCR/CD3 mutante no comprometen la actividad de otros eventos de señalización como la proteína tirosina quinasa ZAP70, ni siquiera a tiempos tardíos, dado que tras la activación el nivel de fosforilación alcanzado es proporcional a la cantidad de proteína TCR $\zeta$  fosforilada (**Figuras 18, 20**). Asimismo, el análisis de diferentes intermediarios de señalización proximal del complejo TCR como LAT, MAPK (ERK1/2 y p38), mTOR eran completamente normales (**Figuras 22-25, 29**). Sin embargo, otros intermediarios como JNK, Vav no eran informativos puesto que su fosforilación era constitutiva (**Figuras 23, 26**).

Además, para excluir que la concentración empleada de anticuerpos anti-CD3, en condiciones saturantes, justificará la normalidad en la fosforilación de la mayoría de los intermediarios de señalización analizados. Nos propusimos analizar las mismas rutas pero en experimentos de dosis-respuesta con concentraciones de anticuerpo limitantes. Nuestros resultados demuestran que intermediarios de fosforilación como la MAPK ERK1/2 es completamente normal incluso a concentraciones limitantes de anticuerpo (**Figuras 23, 24**). Estos resultados justifican la normalidad de dichas rutas de señalización incluso a bajas concentraciones del estímulo.

Sin embargo, en la señalización más distal del complejo TCR si observamos un defecto en la defosforilación de NFAT (**Figura 19**). Esto supone que la isoforma activa de NFAT, la defosforilada, que se une al elemento de respuesta del promotor del gen de la IL-2 no es completamente funcional. Este defecto podría explicar en parte los defectos previamente descritos por nuestro laboratorio como la síntesis de IL-2 que se encuentra afectada en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$  (**Pacheco-Castro A et al, 1998**).

Alternativamente, nos planteamos *¿Cómo sería la respuesta antígeno-específica en ausencia de CD3 $\gamma$ ?* La expansión de los linfocitos primarios iNKT con un complejo TCR invariante y carente de la cadena CD3 $\gamma$  en respuesta a  $\alpha$ -GalCer nos ha demostrado que la respuesta antígeno-específica en ausencia de CD3 $\gamma$  es normal. Las rutas de señalización requeridas para el desarrollo de las células iNKT son parcialmente conocidas (**Godfrey DI et al, 2010**). Estudios previos realizados en ratones transgénicos para la cadena TCR $\zeta$  han demostrado que el desarrollo adecuado de las células iNKT requiere todos los motivos ITAMs de la cadena TCR $\zeta$  (**Becker AM et al, 2010**).

La ausencia de CD3 $\gamma$  nos demuestra que la capacidad funcional/señalización en las células iNKT se encuentra preservada y sin defectos, esto nos indica que frente una respuesta antígeno-específica las células maduras iNKT no requieren el motivo ITAM de la cadena CD3 $\gamma$  (**Figura 31**). Estos resultados son opuestos a los previamente descritos en ratones deficientes para la cadena TCR $\zeta$  los cuales requieren todos los motivos ITAMs para su desarrollo. No obstante, no excluimos que el motivo ITAM de la cadena CD3 $\gamma$  podría ser suplantado por el motivo de la cadena CD3 $\delta$  en el contexto del complejo TCR en las células

deficientes, ni que los requerimientos de las diferentes cadenas CD3 sean completamente distintos entre humano y ratón, como ya hemos observado en el desarrollo de las células T (**Figura 14**).

El análisis de las células iNKT frente a un antígeno-específico nos reveló que las células deficientes presentaban una mayor expresión de la cadena TCRV $\beta$ 11 respecto las células control (**Figura 31**). Por el contrario, esto no se observó en los niveles de TCRV $\alpha$ 24. Además, los niveles de expresión eran similares para ambas cadenas a día cero en comparación con células control (**Figura 32**). Por tanto, estas células fueron selectivamente seleccionadas en respuesta a  $\alpha$ -GalCer *in vitro*. Esto nos hace suponer que durante el desarrollo linfóide estas células fueron expuestas a antígenos presentados por CD1d en el timo, y posteriormente seleccionadas y expandidas en periferia con una mayor expresión del complejo TCRV $\beta$ 11 como consecuencia de su proceso de selección. No obstante, estas diferencias de expresión también podrían ser debidas a un argumento estructural, es decir que en ausencia de CD3 $\gamma$  el complejo TCR invariante de las iNKT adoptase una estructura anómala que favorezca una mayor exposición y reconocimiento del epítipo TCRV $\beta$ 11.

Uno de los procesos cruciales en la activación de la célula T es la reorganización de la actina en el citoesqueleto durante el reconocimiento antigénico. Datos previos de nuestro laboratorio mostraban que la cadena CD3 $\gamma$  era requerida en la adhesión y polimerización de actina (**Torres PS et al, 2002**). Sin embargo, nuestros resultados en respuesta a anticuerpos anti-CD3 demostraron que la reorganización de actina es completamente normal (**Figura 29**). Estas diferencias en ambos resultados podrían ser debidas al empleo de diferentes anticuerpos anti-CD3 (UCHT-1 en vez de OKT3). Asimismo, los estudios de adhesión y polarización fueron realizados en presencia de anticuerpos anti-ICAM-1 inmovilizados en plástico. Por tanto, nuestros resultados de la reorganización de la actina indica que CD3 $\gamma$  no se encuentra relacionada, sin embargo no excluimos que otras rutas de señalización de fuera a dentro (*outside-in*) puedan estar involucradas.

*¿Por qué en ausencia de CD3 $\gamma$  algunas funciones son completamente normales?* En conjunto, nuestros resultados indican que la cadena CD3 $\gamma$  presenta una función redundante para algunas de las rutas de señalización analizadas. Esto explicaría la normalidad de las respuestas previamente descritas por nuestro laboratorio en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$ ,

como el flujo de calcio celular, la citotoxicidad, la inducción de CD69 o CD154, la proliferación y la síntesis de algunas citoquinas (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) (Pérez-Aciego et al, 1991; Arnaiz-Villena et al, 1992; Pacheco-Castro A et al, 1998 y Torres PS et al, 2002).

La normalidad de estas funciones se encuentra justificada por el modelo de multiplicidad de los ITAMs (Pitcher LA et al, 2003). Este modelo propone una redundancia funcional en las cadenas invariantes, es decir que cada uno de los motivos ITAMs de las cadenas CD3 tiene una función equivalente, por tanto todas las cadenas invariantes ejercen un papel amplificador o cuantitativo de la señal. Además, este modelo justificaría el elevado número de motivos ITAMs presentes en un mismo TCR/CD3 basándonos en un argumento más cuantitativo que cualitativo, lo que permitiría una señalización escalonada del complejo TCR/CD3 con objeto de asegurar la selección negativa en el desarrollo linfoide y proporcionar cierto grado de protección frente a potenciales defectos en cualquier parte de la cascada de señalización. Asimismo, se ha demostrado en modelos murinos la existencia del requerimiento de un número mínimo de motivos ITAMs para el correcto desarrollo linfoide, la señalización del complejo pre-TCR, la tolerancia central, la expansión y el mantenimiento de la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Holst J et al, 2008).

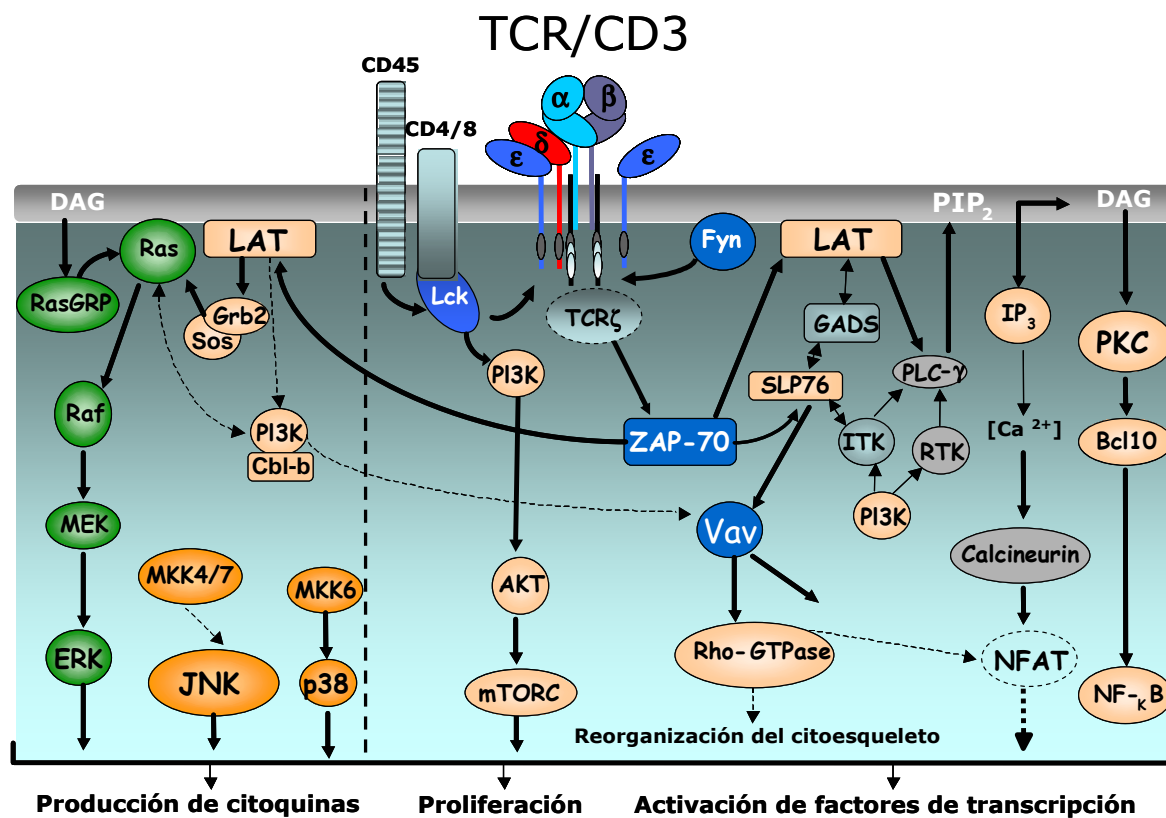
De acuerdo con el razonamiento anterior también nos preguntamos: *¿Existe un número mínimo de motivos ITAMs necesarios para una adecuada transmisión de señales en linfocitos T maduros?* Si se tratase de una función redundante (cuantitativa) podríamos definir un número limitante o umbral de motivos ITAMs para desarrollar una respuesta efectora. De hecho, se ha demostrado en modelos murinos la existencia de una correlación lineal entre el número de motivos y la capacidad de proliferación. Sin embargo, esta correlación no se observa en otro tipo de respuestas como la inducción de citoquinas, siendo su producción completamente normal (Holst J et al, 2008). Asimismo, en el estudio de modelos KO de ratón carentes de motivos ITAMs para algunas cadenas CD3, se demuestra que el complejo TCR/CD3 maduro señala correctamente siempre que contenga un mínimo número de motivos de señalización (Malissen B et al, 1999; CD3 $\delta^{\Delta I / \Delta I}$  Dave VP et al 1997 CD3 $\gamma^{\Delta I / \Delta I}$  Haks MC et al, 2001; y <sup>2/3</sup> ITAMs less de CD3 $\zeta$  Ardouin L et al 1999).

Estos datos indican que al mantener el fenotipo (estructura y expresión) del complejo TCR/CD3 (y en todos los modelos citados se mantiene) se preserva la función/señalización, y



que obviamente no es llevada a cabo por los ITAMs ausentes. Por tanto, estas funciones serían redundantes y asumibles por los otros motivos del complejo, aunque existen secuencias de estas cadenas que desempeñan papeles funcionales específicos como el motivo dileucina de CD3 $\gamma$  (von Essen M et al, 2002).

Sin embargo, *¿Cómo nos explicamos los defectos observados en la señalización del complejo TCR a la falta de CD3 $\gamma$ ?* La justificación de los defectos observados en funciones distales no redundantes son explicadas a través de un segundo modelo no excluyente al anterior que aboga por la especificidad de las funciones, de modo que cada una de las cadenas invariantes ejerce una función inequívoca e insustituible (Pitcher LA et al, 2003). Por tanto, la ausencia de la cadena CD3 $\gamma$  da lugar a defectos de la función/señalización dentro del complejo TCR y que no pueden ser reemplazados por ninguna otra cadena. De hecho, en la transmisión de señales en ausencia de la cadena CD3 $\gamma$ , hemos observado un defecto en la fosforilación de la cadena TCR $\zeta$  y en la defosforilación de NFAT. El defecto de fosforilación podría estar justificado por la mala asociación del homodímero CD3 $\zeta$  al TCR/CD3 mutante (Zapata DA et al, 1999 y 2004), mientras que el defecto de defosforilación podría ser una de las causas de la desregulación en la síntesis de IL-2 en células deficientes.



**Figura 38.** Representación esquemática de las rutas de transmisión de señales intracelular tras la activación del complejo TCR/CD3 en ausencia de CD3γ. Nuestros resultados indican que la cadena CD3γno es imprescindible en la mayoría de las rutas analizadas como la fosforilación de algunos sustratos (ZAP70, LAT, mTORC2, ERK1/2 y p38). Sin embargo, se observaron defectos en la fosforilación de otros sustratos como CD3ζ o en la defosforilación de NFAT.

## 2. La deficiencia adquirida (*Knock-down*) de CD3 $\delta$ dificulta la expresión y algunas funciones del complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros.

Las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  son las más homologas dentro del complejo TCR. La ontogenia y evolución de ambas cadenas a partir de un gen ancestral común mediante duplicación sugiere que comparten funciones redundantes en el complejo TCR (y pre-TCR) (De Saint Basile G et al, 2004; Dadi HK et al, 2003; Fernández-Malavé E et al, 2006; Bernot A et al, 1991). Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, los requerimientos de cada una de estas cadenas difieren en el desarrollo linfoide tanto en humanos como ratones (**Figura 14**), en concreto, no se conoce si la contribución de la cadena CD3 $\delta$  en los linfocitos T es estructural, funcional o ambas. Nosotros nos propusimos conocer su contribución al analizar el efecto de su deficiencia adquirida mediante interferencia (*Knock-Down*) en linfocitos T maduros en comparación con los mutantes naturales de CD3 $\gamma$ .

### 2.1. ¿Cómo afecta la deficiencia congénita de CD3 $\delta$ a la expresión y función del complejo TCR/CD3?

Una de las limitaciones en el estudio de la cadena CD3 $\delta$  es que su ausencia da lugar a una carencia de linfocitos T $\alpha\beta$  maduros tanto en humanos como en ratones (**Figura 14**). Esto sugiere que la cadena CD3 $\delta$  debe ejercer un papel crítico en el desarrollo linfoide y en el ensamblaje del complejo pre-TCR. Además, a diferencia de TCR $\gamma\delta$ , el complejo TCR $\alpha\beta$  contiene un motivo conservado en la evolución, localizado en la parte constante de la cadena TCR $\alpha$ , y que parece ser crítico en la selección de los T $\alpha\beta$  a través de su asociación a la cadena CD3 $\delta$  (Bäckström BT et al, 1996; Werlen GB et al, 2000).

Desde el punto de vista funcional, en ausencia de CD3 $\delta$ , los timocitos de ratón son incapaces de señalizar a través de la cascada de señalización de LAT/Ras/ERK (Delgado P et al, 2000). Además, otros parámetros funcionales se encuentran afectados como el flujo de calcio, la inducción de CD69 y la fosforilación de la PLC $\gamma$ -1. No obstante, no sucede así con el resto de MAPKs (JNK y p38) que son plenamente funcionales (Delgado P et al, 2000).

Además, la activación de las MAPKs se encuentra directamente relacionada con la selección tímica. De hecho, la fosforilación de ERK1/2 se encuentra vinculada a la selección positiva, mientras que la fosforilación de JNK y p38 está vinculada a la selección negativa. Por tanto, se sugiere que la cadena CD3 $\delta$  es necesaria para la señalización de la ruta LAT/Ras/ERK y obviamente para la selección positiva en la diferenciación linfóide de los linfocitos T $\alpha\beta$  en ratones.

Mientras tanto, en humanos, la ausencia total de la cadena CD3 $\delta$  da lugar a un bloqueo completo del desarrollo linfóide con una ausencia total de linfocitos maduros T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  en periferia lo que dificulta su estudio (**Dadi HK et al, 2003; De Saint-Basile G et al, 2004; Figura 14**). Aunque recientemente se ha descrito en nuestro laboratorio una nueva mutación en *splicing* para el gen *CD3D* que permite acotar el papel de la cadena CD3 $\delta$ , en dos pacientes no relacionados con un bloqueo selectivo para células T $\alpha\beta$  pero no T $\gamma\delta$  (**Gil J et al, 2011**). Ambos pacientes muestran una severa reducción de la expresión del complejo TCR y de las subpoblaciones B y NK normales (véase **Tabla III**). Desde el punto de vista funcional, se detectaron defectos en la inducción de marcadores de activación (CD25 y CD69).

*¿Qué efecto ejerce la ausencia de CD3 $\delta$  en la población T $\gamma\delta$ ?* Las células T $\gamma\delta$  de ratones deficientes para CD3 $\delta$  no requieren dicha cadena en su ensamblaje, ni en la estequiometría del receptor (**Hayes SM et al, 2002**). Además, se detectan números normales de dichas células en timo y periferia (**Dave VP et al, 1997**). Por tanto, no se requiere la cadena CD3 $\delta$  para el desarrollo tímico de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$  en ratón, aunque sí es necesaria para el desarrollo completo de los linfocitos T $\alpha\beta$ . Esto sugiere que la cadena CD3 $\delta$  no es necesaria para la construcción del complejo TCR $\gamma\delta$  en ratones, y proporciona diferencias cualitativas en la señalización para cada uno de los linajes T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$ . Asimismo, en el ensamblaje del complejo TCR $\gamma\delta$  no son requeridos los heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$  y su estequiometría final es  $\gamma\delta/\gamma\epsilon\gamma\epsilon\zeta\zeta$  (**Hayes SM et al, 2006; Siegers GM et al, 2007**). Además, desde el punto de vista funcional las células TCR $\gamma\delta$  presentan una movilización del flujo de calcio y una fosforilación de ERK1/2 normales.

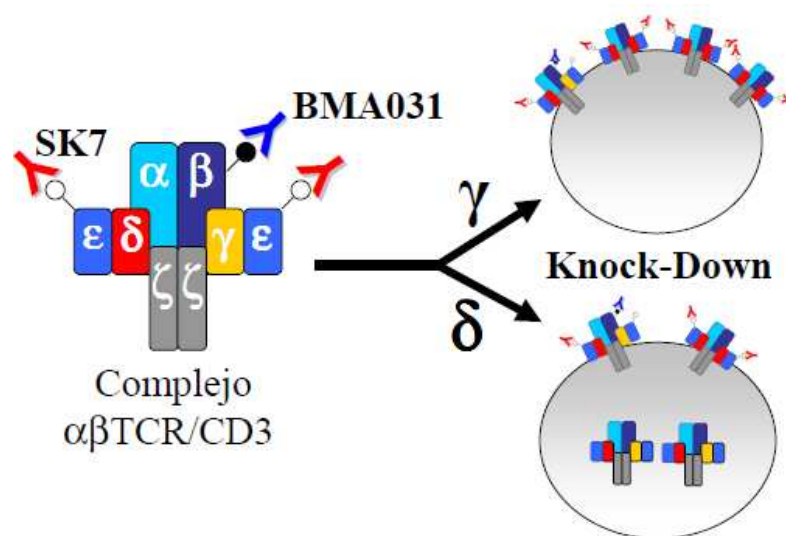
## 2.2. ¿Cómo afecta la deficiencia adquirida (*Knock-down*) de CD3 $\delta$ y CD3 $\gamma$ a la expresión y función del complejo TCR/CD3?

Nuestros resultados han mostrado que la cadena CD3 $\delta$  ejerce un papel crítico ( $\delta \gg \gamma$ ) en la construcción, el ensamblaje y la expresión del complejo TCR, dado que su ausencia da lugar a una reducción equivalente de la expresión del complejo TCR/CD3 con todos los anticuerpos analizados (**Figuras 35, 36**). El silenciamiento de CD3 $\gamma$  ofrece en cambio un defecto marginal detectado únicamente por algunos anticuerpos monoclonales pero no todos (**Figuras 35, 36**). La disparidad en el reconocimiento epitópico y la variabilidad de la reactividad de algunos de los anticuerpos monoclonales empleados sugieren que las diferencias observadas pueden estar relacionadas con la estabilidad, el ensamblaje y la topología final del complejo TCR/CD3.

El modelo de ensamblaje del complejo TCR/CD3 propuesto por Call ME et al (2004) demuestra que durante el ensamblaje, el dímero CD3 $\delta\epsilon$  entra en primer lugar uniéndose a TCR $\alpha$ , posteriormente se une el dímero CD3 $\gamma\epsilon$  al TCR $\beta$  y finalmente el homodímero CD3 $\zeta\zeta$  (**Figura 3**). En el caso del receptor mutante TCRCD3 $\gamma^{-/-}$ , el ensamblaje sería diferente al carecer de la cadena CD3 $\gamma$ . No sólo un dímero CD3 $\delta\epsilon$  se uniría a la cadena TCR $\alpha$ , sino que otro dímero similar lo haría, aunque de modo imperfecto, a la cadena TCR $\beta$  ocupando el espacio del inexistente CD3 $\gamma\epsilon$  y permitiendo un débil acoplamiento del homodímero CD3 $\zeta\zeta$  (Zapata DA et al 1999, 2004).

Nuestros resultados muestran que la cadena CD3 $\delta$  proporciona una estabilidad crítica ( $\delta \gg \gamma$ ) en el complejo TCR/CD3 puesto que su ausencia parcial tras el silenciamiento (KD) da lugar a una caída del número de receptores en superficie, y ninguna otra cadena invariante puede reemplazar su lugar. La reducción de la cadena CD3 $\delta$  conlleva una reducción de los heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$  disponibles para el ensamblaje, lo que se traduce en una menor construcción de complejos en la superficie dado que sólo los heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$  pueden unirse a la cadena TCR $\alpha$  de acuerdo con el modelo propuesto por Call ME et al (2004). Este argumento cuantitativo explicaría la reducción de expresión del complejo TCR/CD3 observada con todos los anticuerpos analizados (**Figura 38**).

No sucede así con la cadena CD3 $\gamma$  puesto que su ausencia podría ser suplantada por CD3 $\delta$  que permite la expresión y aporta el motivo ITAM, sin embargo la estructura del complejo TCR/CD3 es aberrante y con mala asociación a TCR $\zeta$  (Zapata DA et al 1999, 2004). Por tanto, estructuralmente, la ausencia parcial de CD3 $\gamma$  daría lugar a una reducción de los heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$ , y estos podrían ser compensados por los heterodímeros CD3 $\delta\epsilon$  en el contexto del complejo TCR permitiendo la construcción de complejos (**Figura 38**). Este argumento cualitativo está basado en la suplantación de una cadena por otra, y podría explicar la disparidad en la expresión de algunos anticuerpos que son más dependientes que otros de los heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$ .



**Figura 39. Modelo propuesto sobre la contribución de las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  en el ensamblaje y expresión del complejo TCR/CD3 tras el *Knock-Down*.** La ausencia de CD3 $\delta$  pero no CD3 $\gamma$  es más limitante en la construcción de complejos dado que ninguna otra cadena puede reemplazar su lugar, y esto se traduce en un menor número de receptores en superficie. Estos resultados justifican la disparidad en la detección mediante anticuerpos dependientes (BMA031) o no (SK7) de los heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$  del complejo TCR/CD3.

*¿Cómo es la función del complejo TCR/CD3 tras el silenciamiento de las cadenas CD3 $\delta$  y CD3 $\gamma$ ?* Para delimitar la funcionalidad se monitorizaron parámetros funcionales básicos como la inducción de marcadores de activación como CD69, el flujo de calcio y la internalización del complejo TCR/CD3 mediada por PMA.

En el caso de CD3 $\delta$ , los defectos observados en la inducción de calcio podrían ser debidos a un argumento meramente cuantitativo, es decir que al existir un menor número de receptores en superficie la cantidad de señal emitida es menor (**Figura 37**). Por el contrario, la internalización del complejo TCR/CD3 mediada por PMA es completamente normal dado que sólo mapea a CD3 $\gamma$ , no a CD3 $\delta$ . No obstante, los defectos funcionales siempre fueron

más severos en el *Knock-Down* de CD3 $\delta$  que CD3 $\gamma$ , al ser más limitante en la construcción de complejos en superficie, generando una cantidad de señal emitida significativamente menor. Mientras, en el caso de CD3 $\gamma$ , sólo se observaron defectos en la internalización mediada por PMA dado que sólo mapea dicha cadena (**von Essen M et al, 2002; Torres PS et al 2003**), y la inducción del flujo de calcio se encontró levemente afectada (**Figura 37**). Finalmente, la inducción de marcadores de activación como CD69 fue completamente normal. Esta normalidad en la inducción de CD69 podría ser consecuencia de una respuesta inespecífica inherente a la propia técnica del silenciamiento. Las causas podrían ser debidas a la propia electroporación dado que genera un importante estrés celular o bien a la propia naturaleza del siRNA que podría desencadenar una activación inespecífica de la célula silenciada.. Asimismo, estudios realizados con siRNA dirigidos hacia la proteína tirosina quinasa Lck en linfocitos T maduros han mostrado un aumento de la fosforilación y de la activación de intermediarios tardíos como ERK (**Methi T et al, 2005**). Por tanto, es posible que tras el silenciamiento de CD3 $\delta$  se generen mecanismos de compensación en respuesta a la interferencia que expliquen la normalidad en la inducción del marcador CD69.

En conjunto, estos resultados nos indican que en linfocitos T maduros la cadena CD3 $\delta$  es más limitante que CD3 $\gamma$  en la estructura y función del complejo TCR/CD3. La suplantación de la cadena CD3 $\delta$  por CD3 $\gamma$ , en ausencia de esta última, permite la formación de complejos TCR anómalos pero que pueden suplir las funciones redundantes en las que participan ambas cadenas, aunque no las funciones específicas (como la internalización de la PMA a través de la cadena CD3 $\gamma$ ). La cadena CD3 $\gamma$  optimiza la eficacia de la señalización del complejo TCR y la supervivencia dado que su ausencia conlleva defectos en la fosforilación y defosforilación de la cadena TCR $\zeta$  y NFAT respectivamente, y podría ser causa de algunos de los defectos descritos previamente en células deficientes, como la síntesis de IL-2 observada en las líneas transformadas.

1. La cadena CD3 $\gamma$  optimiza la eficacia de la señalización del complejo TCR y la supervivencia en humanos dado que su ausencia conlleva defectos en la fosforilación y defosforilación de la cadena TCR $\zeta$  y NFAT respectivamente, que podrían ser causantes de algunos de los defectos previamente descritos en nuestro laboratorio como la síntesis de IL-2.
2. La cadena CD3 $\gamma$  en humanos presenta una redundancia funcional compartida con el resto de cadenas invariantes para determinadas rutas de señalización intracelular del complejo TCR (ZAP-70, ERK, p38, mTORC y polimerización de la actina), y en respuestas biológicas tardías (expansión de células iNKT en respuesta a  $\alpha$ -GalCer).
3. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la señalización a través del complejo TCR/CD3 deficiente en CD3 $\gamma$  es suficiente para el desarrollo de una respuesta inmune. Desde el punto de vista clínico explicaría la supervivencia de dos de los cinco pacientes descritos en tres familias, en esta inmunodeficiencias, hasta la segunda y tercera década de su vida.
4. Las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  comparten un alto grado de homología entre ellas, sin embargo el requerimiento de cada una difiere en la expresión, el ensamblaje y la función del complejo TCR/CD3 (CD3 $\delta$ >>CD3 $\gamma$ ) tanto en las inmunodeficiencias congénitas como adquiridas (*Knock-down*).
5. La cadena CD3 $\delta$ , a diferencia de CD3 $\gamma$ , proporciona una estabilidad crítica y una función no redundante ( $\delta$ >> $\gamma$ ) en el complejo TCR/CD3 en linfocitos T maduros. Su falta congénita conlleva un bloqueo completo del desarrollo de los linfocitos T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  en humanos. Sin embargo, su ausencia parcial (adquirida mediante KD) da lugar a una reducción severa del número de receptores en superficie, y un defecto funcional en la activación celular dado que ninguna otra cadena invariante puede reemplazar su papel.





1. Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science*. 2005 Apr 8;308(5719):227-31.
2. Alarcón B, Gil D, Delgado P, Schamel WW. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev*. 2003 Feb;191:38-46.
3. Alibaud L, Arnaud J, Llobera R, Rubin B. On the role of CD3delta chains in TCRgammadelta/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand J Immunol*. 2001 Jul-Aug;54(1-2):155-62.
4. Alvarez-Zapata D, de Miguel Olalla S, Fontán G, Ferreira A, García-Rodríguez MC, Madero L, van den Elsen P, Regueiro JR. Phenotypical and functional characterization of Herpesvirus saimiri-immortalized human major histocompatibility complex class II-deficient T lymphocytes. *Tissue Antigens*. 1998 Mar;51(3):250-7.
5. Appleby MW, Gross JA, Cooke MP, Levin SD, Qian X, Perlmutter RM. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell*. 1992 Sep 4;70(5):751-63.
6. Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez-Aciego P, Martín-Villa JM and Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N.Engl.J. Med*. 1992 (327) 529-533.
7. Arnett KL, Harrison SC, Wiley DC. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 16;101(46):16268-73.
8. Bäckström BT, Milia E, Peter A, Jaureguierry B, Baldari CT, Palmer E. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity*. 1996 Nov;5(5):437-47.
9. Becker AM, Blevins JS, Tomson FL, Eitson JL, Medeiros JJ, Yarovinsky F, Norgard MV and van Oers NS. Invariant NKT cell development requires a full complement of functional CD3 zeta immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J.Immunol*. 2010 (184) 6822-6832.
10. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336. Review.
11. Bernot A, Auffray C. Primary structure and ontogeny of an avian CD3 transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 15;88(6):2550-4.
12. Biesinger B, Müller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzer E, Desrosiers RC, Fleckenstein B. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):3116-9.
13. Biesinger B, Trimble JJ, Desrosiers RC, Fleckenstein B. The divergence between two oncogenic Herpesvirus saimiri strains in a genomic region related to the transforming phenotype. *Virology*. 1990 Jun;176(2):505-14.
14. Biesinger B, Tsygankov AY, Fickenscher H, Emmrich F, Fleckenstein B, Bolen JB, Bröker BM. The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J Biol Chem*. 1995 Mar 3;270(9):4729-34.
15. Blumberg RS, Alarcon B, Sancho J, McDermott FV, Lopez P, Breitmeyer J, Terhorst C. Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J Biol Chem*. 1990 Aug 15;265(23):14036-43.
16. Boding L, Bonefeld CM, Nielsen BL, Lauritsen JP, von Essen MR, Hansen AK, Larsen JM, Nielsen MM, Odum N, Geisler C. TCR down-regulation controls T cell homeostasis. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):4994-5005.
17. Bolliger L, Johansson B, Palmer E. The short extracellular domain of the T cell receptor zeta chain is involved in assembly and signal transduction. *Mol Immunol*. 1997 Aug-Sep;34(12-13):819-27.

18. Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L, Wilce MC, Pellicci DG, Koh R, Besra GS, Bharadwaj M, Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*. 2007 Jul 5;448(7149):44-9.
19. Borroto A, Mallabiabarrena A, Albar JP, Martínez-A C, Alarcón B. Characterization of the region involved in CD3 pairwise interactions within the T cell receptor complex. *J Biol Chem*. 1998 May 22;273(21):12807-16.
20. Brenner MB, McLean J, Scheft H, Riberdy J, Ang SL, Seidman JG, Devlin P, Krangel MS. Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):689-94.
21. Bröker BM, Tsygankov AY, Müller-Fleckenstein I, Guse AH, Chitaev NA, Biesinger B, Fleckenstein B, Emmrich F. Immortalization of human T cell clones by Herpesvirus saimiri. Signal transduction analysis reveals functional CD3, CD4, and IL-2 receptors. *J Immunol*. 1993 Aug 1;151(3):1184-92.
22. Brossay L, Naidenko O, Burdin N, Matsuda J, Sakai T, Kronenberg M. Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NK T cells. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5124-8.
23. Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med*. 1987 Aug 1;166(2):577-82.
24. Buer J, Aifantis I, DiSanto JP, Fehling HJ, von Boehmer H. T-cell development in the absence of the pre-T-cell receptor. *Immunol Lett*. 1997 Jun 1;57(1-3):5-8.
25. Bunnell SC, Kapoor V, Triple RP, Zhang W, Samelson LE. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 2001 Mar;14(3):315-29.
26. Cabanillas JA, Cambronero R, Pacheco-Castro A, García-Rodríguez MC, Martín-Fernández JM, Fontán G, Regueiro JR. Characterization of Herpesvirus saimiri-transformed T lymphocytes from common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol*. 2002 Feb;127(2):366-73.
27. Call ME, Wucherpfennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol*. 2004 Apr;40(18):1295-305. Review.
28. Cannon JL, Burkhardt JK. The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunol Rev*. 2002 Aug;186:90-9. Review.
29. Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:259-74. Review.
30. Caspar-Bauguil S, Arnaud J, Gouaillard C, Hou X, Geisler C, Rubin B. Functionally important amino acids in the TCR revealed by immunoselection of membrane TCR-negative T cells. *J Immunol*. 1994 Jun 1;152(11):5288-98.
31. Caspar-Bauguil S, Arnaud J, Huchenaq A, Hein WR, Geisler C, Rubin B. A highly conserved phenylalanine in the alpha, beta-T cell receptor (TCR) constant region determines the integrity of TCR/CD3 complexes. *Scand J Immunol*. 1994 Sep;40(3):323-36.
32. Ciofani M, Schmitt TM, Ciofani A, Michie AM, Cuburu N, Aublin A, Maryanski JL, Zúñiga-Pflücker JC. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5230-9.
33. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-62.
34. Cope AP. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S197-211. Epub 2002 May 9. Review.
35. Copp J, Manning G and Hunter T. TORC-specific phosphorylation of mTOR: phospho-Ser2481 is a marker for intact mTORC2. *Cancer Res*. 2009 March 1; 69(5):1821-1827.
36. Cosson P, Lankford SP, Bonifacio JS, Klausner RD. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):414-6.

37. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S67-79. Review.
38. Craston R, Koh M, Mc Dermott A, Ray N, Prentice HG, Lowdell MW. Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *J Immunol Methods*. 1997 Nov 10;209(1):37-45.
39. Croudace JE, Curbishley SM, Mura M, Willcox CR, Illarionov PA, Besra GS, Adams DH, Lammas DA. Identification of distinct human invariant natural killer T-cell response phenotypes to alpha-galactosylceramide. *BMC Immunol*. 2008 Dec 3;9:71.
40. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992 Nov 13;71(4):649-62.
41. Chan SM, Olson JA, Utz PJ. Single-cell analysis of siRNA-mediated gene silencing using multiparameter flow cytometry. *Cytometry A*. 2006 Feb;69(2):59-65.
42. Chiba A, Cohen N, Brigl M, Brennan PJ, Besra GS, Brenner MB. Rapid and reliable generation of invariant natural killer T-cell lines in vitro. *Immunology*. 2009 Nov;128(3):324-33.
43. Cho S, Velikovsky CA, Swaminathan CP, Houtman JC, Samelson LE, Mariuzza RA. Structural basis for differential recognition of tyrosine-phosphorylated sites in the linker for activation of T cells (LAT) by the adaptor Gads. *EMBO J*. 2004 Apr 7;23(7):1441-51.
44. Dadi HK, Simon AJ and Roifman CM. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N.Engl.J.Med*. 2003 (349) 1821-1828.
45. Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*. 2001 Jul;15(1):83-93.
46. Dave VP, Cao Z, Browne C, Alarcon B, Fernandez-Miguel G, Lafaille J, de la HA, Tonegawa S and Kappes DJ. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J*. 1997 (16) 1360-1370.
47. De Carli M, Berthold S, Fickenscher H, Fleckenstein IM, D'Elios MM, Gao Q, Biagiotti R, Giudizi MG, Kalden JR, Fleckenstein B, et al. Immortalization with herpesvirus saimiri modulates the cytokine secretion profile of established Th1 and Th2 human T cell clones. *J Immunol*. 1993 Nov 1;151(9):5022-30.
48. De Saint Basile G, Geissmann F, Flori E, Uring-Lambert B, Soudais C, Cavazzana-Calvo M, Durandy A, Jabado N, Fischer A, Le Deist F. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J. Clin. Invest*. 2004 (114) 1512-1517.
49. De Silva AD, Park JJ, Matsuki N, Stanic AK, Brutkiewicz RR, Medof ME, Joyce S. Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):723-33.
50. DeJarnette JB, Sommers CL, Huang K, Woodside KJ, Emmons R, Katz K, Shores EW, Love PE. Specific requirement for CD3epsilon in T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14909-14.
51. Delgado P, Fernández E, Dave V, Kappes D, Alarcón B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature*. 2000 Jul 27;406(6794):426-30.
52. Duboise SM, Guo J, Czajak S, Desrosiers RC, Jung JU. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J Virol*. 1998 Feb;72(2):1308-13.
53. Eberl G, Lowin-Kropf B, MacDonald HR. Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice. *J Immunol*. 1999 Oct 15;163(8):4091-4.
54. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jan 15;90(2):720-4.
55. Evans GA, Garcia GG, Erwin R, Howard OM, Farrar WL. Pervanadate simulates the effects of interleukin-

- 2 (IL-2) in human T cells and provides evidence for the activation of two distinct tyrosine kinase pathways by IL-2. *J Biol Chem.* 1994. Sep 23;269(38):23407-12.
56. Exley M, Varticovski L, Peter M, Sancho J, Terhorst C. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem.* 1994 May 27;269(21):15140-6.
57. Fernández-Malavé E, Wang N, Pulgar M, Schamel WW, Alarcón B, Terhorst C. Overlapping functions of human CD3delta and mouse CD3gamma in alphabeta T-cell development revealed in a humanized CD3gamma-mouse. *Blood.* 2006 Nov 15;108(10):3420-7.
58. Fickenscher H and B Fleckenstein. Herpesvirus saimiri. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 2001. 356:545-567.
59. Fickenscher H, Biesinger B, Knappe A, Wittmann S and Fleckenstein B. Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J.Virol.* 1996. 70:6012-6019.
60. Fickenscher H, Bokel C, Knappe A, Biesinger B, Meinel E, Fleischer B, Fleckenstein B and Broker BM. Functional phenotype of transformed human alphabeta and gammadelta T cells determined by different subgroup C strains of herpesvirus Saimiri. *J.Virol.* 1997. 71:2252-2263.
61. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Mailliet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SH, Schaible UE. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 20;101(29):10685-90.
62. Freitas AA, Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:83-111. Review.
63. Fremont DH, Rees WA, Kozono H. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr Opin Immunol.* 1996 Feb;8(1):93-100. Review.
64. Fuller CL, Braciale VL, Samelson LE. All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton. *Immunol Rev.* 2003 Feb;191:220-36. Review.
65. Gallego MD, Santamaría M, Pena J and Molina JJ. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood.* 1997 (90) 3089-3097.
66. Garcia KC, Adams EJ. How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell.* 2005 Aug 12;122(3):333-6. Review.
67. Geisler C, Rubin B, Caspar-Bauguil S, Champagne E, Vangsted A, Hou X, Gajhede M. Structural mutations of C-domains in members of the Ig superfamily. Consequences for the interactions between the T cell antigen receptor and the zeta 2 homodimer. *J Immunol.* 1992 Jun 1;148(11):3469-77.
68. Gil J, Busto EM, Chean C, Garcillán B, Cruz García-Rodríguez M, Díaz-Alderete A, Navarro J, Reiné J, Mencía A, Gurbindo D, Beléndez C, Gordillo I, Duchniewicz M, Höhne K, López-Granados E, Schammel WW, Moreno-Pelayo MA, Recio MJ, Regueiro JR. A leaky mutation in CD3D leads to a  $\alpha\beta^{-}\gamma\delta^{+}B^{+}NK^{+}$  human SCID. *J. Clin. Invest.* 2011.
69. Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev.* 2003 Oct;195:28-50. Review.
70. Göbel TW, Fluri M. Identification and analysis of the chicken CD3epsilon gene. *Eur J Immunol.* 1997 Jan;27(1):194-8.
71. Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J and Rossjohn J. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin.Immunol.* 2010 (22) 61-67.
72. Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. The fidelity, occasional promiscuity, and versatility of T cell receptor recognition. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):304-14. Review.
73. Gómez del Arco P, Martínez-Martínez S, Maldonado JL, Ortega-Pérez I, Redondo JM. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem.* 2000. May 5;275(18):13872-8.

74. Guy CS, Vignali DA. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol Rev.* 2009 Nov;232(1):7-21. Review.
75. Haks MC, Cordaro TA, van den Brakel JH, Haanen JB, de Vries EF, Borst J, Krimpenfort P, Kruisbeek AM. A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J Immunol.* 2001 Feb 15;166(4):2576-88.
76. Haks MC, Krimpenfort P, Borst J and Kruisbeek AM. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. *EMBO J.* 17 (1998)1871-1882.
77. Hayday, A. C., Gamma delta cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000. 18: 975-1026.
78. Hayes SM, Laky K, El-Khoury D, Kappes DJ, Fowlkes BJ, Love PE. Activation-induced modification in the CD3 complex of the gammadelta T cell receptor. *J Exp Med.* 2002 Nov 18;196(10):1355-61.
79. Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine gammadelta T cell receptor. *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):47-52.
80. Hayes SM, Shores EW, Love PE. An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors. *Immunol Rev.* 2003 Feb;191:28-37. Review.
81. Hickman SP, Yang J, Thomas RM, Wells AD, Turka LA. Defective activation of protein kinase C and Ras-ERK pathways limits IL-2 production and proliferation by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006 Aug 15;177(4):2186-94.
82. Ho HY, Cheng ML, Wang YH, Chiu DT. Flow cytometry for assessment of the efficacy of siRNA. *Cytometry A.* 2006 Oct 1;69(10):1054-61.
83. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):772-82. Review.
84. Holst J, Wang H, Eder KD, Workman CJ, Boyd KL, Baquet Z, Singh H, Forbes K, Chruscinski A, Smeyne R, van Oers NS, Utz PJ, Vignali DA. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):658-66.
85. Holst J, Wang H, Eder KD, Workman CJ, Boyd KL, Baquet Z, Singh H, Forbes K, Chruscinski A, Smeyne R, van Oers NS, Utz PJ and Vignali DA. Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol.* 9 (2008) 658-666.
86. Huchenq-Champagne A, Arnaud J, Bouchouata C, Gouaillard C, Llobera R, Rubin B. On the genetic mechanism of induction of CD3gamma-negative human T cell variants. *Eur J Immunol.* 2000 Feb;30(2):614-9.
87. Imbert V, Peyron JF, Farahi Far D, Mari B, Auberger P, Rossi B. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *Biochem J.* 1994 Jan 1;297 ( Pt 1):163-73.
88. Inatsuki A, Yasukawa M and Kobayashi Y. Functional alterations of herpes simplex virus-specific CD4+ multifunctional T cell clones following infection with human T lymphotropic virus type I. *J.Immunol.* 1989 (143)1327-1333.
89. Irving BA and Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell.* 1991. 64:891-901.
90. Irving BA, Chan AC and Weiss A. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J.Exp.Med.* 1993. 177:1093-1103.
91. Isakov N, Wange RL, Burgess WH, Watts JD, Aebersold R and Samelson LR.. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J.Exp.Med.* 1995. 181:375-380.
92. Jin YJ, Friedman J, Burakoff SJ. Regulation of tyrosine phosphorylation in isolated T cell membrane

- by inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J Immunol.* 1998 Aug 15;161(4):1743-50.
93. Kaizuka Y, Douglass AD, Varma R, Dustin ML, Vale RD. Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 18;104(51):20296-301. Epub 2007 Dec 12.
94. Kane LP, Lin J and Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:242-249.
95. Kappes DJ, Tonegawa S. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10619-23.
96. Karadimitris A, Gadola S, Altamirano M, Brown D, Woolfson A, Klenerman P, Chen JL, Koezuka Y, Roberts IA, Price DA, Dusheiko G, Milstein C, Fersht A, Luzzatto L, Cerundolo V. Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98(6):3294-8.
97. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science.* 1997 Nov 28;278(5343):1626-9.
98. Keusch JJ, Manzella SM, Nyame KA, Cummings RD, Baenziger JU. Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb3 synthase, that directs the synthesis of isoglobos-glycosphingolipids. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25308-14.
99. Kim ST, Takeuchi K, Sun ZY, Touma M, Castro CE, Fahmy A, Lang MJ, Wagner G, Reinherz EL. The alphabeta T cell receptor is an anisotropic mechanosensor. *J Biol Chem.* 2009 Nov 6;284(45):31028-37.
100. Kim ST, Touma M, Takeuchi K, Sun ZY, Dave VP, Kappes DJ, Wagner G, Reinherz EL. Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of alpha beta T cell receptors. *J Immunol.* 2010 Sep 1;185(5):2951-9.
101. Kim ST, Touma M, Takeuchi K, Sun ZY, Dave VP, Kappes DJ, Wagner G, Reinherz EL. Distinctive CD3 heterodimeric ectodomain topologies maximize antigen-triggered activation of alpha beta T cell receptors. *J Immunol.* 2010 Sep 1;185(5):2951-9.
102. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M, Gershwin ME. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology.* 2002 Oct;123(4):1031-43.
103. Kjer-Nielsen L, Dunstone MA, Kostenko L, Ely LK, Beddoe T, Mifsud NA, Purcell AW, Brooks AG, McCluskey J, Rossjohn J. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 18;101(20):7675-80.
104. Knappe A, Hiller C, Thureau M, Wittmann S, Hofmann H, Fleckenstein B, Fickenscher H. The superantigen-homologous viral immediate-early gene ie14/vsag in herpesvirus saimiri-transformed human T cells. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9124-33.
105. Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin Immunol.* 2004 Mar;110(3):206-21. Review.
106. Krutzik PO, Nolan GP. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry A.* 2003 Oct;55(2):61-70.
107. Krutzik PO, Trejo A, Schulz KR, Nolan GP. Phospho flow cytometry methods for the analysis of kinase signaling in cell lines and primary human blood samples. *Methods Mol Biol.* 2011;699:179-202.
108. Laird RM, Hayes SM. Dynamics of CD3gammaepsilon and CD3deltaepsilon dimer expression during murine T cell development. *Mol Immunol.* 2009 Dec;47(2-3):582-9.
109. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and

- CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med.* 1994 Sep 1;180(3):1097-106.
110. Latour S, Veillette A. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 2001 Jun;13(3):299-306. Review.
111. Le Deist F, de Saint Basile G, Rieux-Laucat F, Hivroz C, Fischer A. Expression anomalies of the CD3-TCR complex expression and immunodeficiencies. *Med Sci (Paris).* 2007 Feb;23(2):161-6. Review. French.
112. Le Deist F, Thoenes G, Corado J, Lisowska-Grospierre B, Fischer A. Immunodeficiency with low expression of the T cell receptor/CD3 complex. Effect on T lymphocyte activation. *Eur J Immunol.* 1991 Jul;21(7):1641-7.
113. Legendre V, Guimezanes A, Buferne M, Barad M, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C. Antigen-induced TCR-CD3 down-modulation does not require CD3delta or CD3gamma cytoplasmic domains, necessary in response to anti-CD3 antibody. *Int Immunol.* 1999 Nov;11(11):1731-8.
114. Letourneur F and Klausner RD. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science.* 1992. 255:79-82.
115. Li H, Lebedeva MI. Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature.* 1998 391(6666): 502-6.
116. Liu H, Rhodes M, Wiest DL and Vignali DA. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 2000. 13:665-675.
117. Love PE, Chan AC. Regulation of thymocyte development: only the meek survive. *Curr Opin Immunol.* 2003 Apr;15(2):199-203.
118. Love PE, Lee J, Shores EW. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3080-7.
119. Love PE, Shores EW, Johnson MD, Tremblay ML, Lee EJ, Grinberg A, Huang SP, Singer A, Westphal H. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science.* 1993 Aug 13;261(5123):918-21.
120. Love PE, Shores EW. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity.* 2000 Jun;12(6):591-7. Review.
121. Luton F, Buferne M, Legendre V, Chauvet E, Boyer C, Schmitt-Verhulst AM. Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J Immunol.* 1997 May 1;158(9):4162-70.
122. Lyons AB. Analysing cell activation *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol Methods.* 2000; 243:147-54.
123. Mackall CL, Granger L. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood.* 1993. 82(8):2585-94.
124. Malissen B, Aguado E, Malissen M. Role of the LAT adaptor in T-cell development and Th2 differentiation. *Adv Immunol.* 2005;87:1-25. Review
125. Malissen B, Ardouin L, Lin SY, Gillet A and Malissen M. Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv.Immunol.* 1999. (72) 103-148.
126. Malissen B, Ku G, Hermans M, Vivier E, Malissen M. Genetic dissection of the transducing subunits of the T-cell antigen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Sep 7;766:173-81. Review.
127. Malissen B, Schmitt-Verhulst AM. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. *Curr Opin Immunol.* 1993 Jun;5(3):324-33. Review.
128. Manolios N, Kemp O, Li ZG. The T cell antigen receptor alpha and beta chains interact via distinct regions with CD3 chains. *Eur J Immunol.* 1994 Jan;24(1):84-92.
129. Manolios N, Letourneur F, Bonifacio JS, Klausner RD. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *EMBO J.* 1991 Jul;10(7):1643-51.



130. Mantei A, Rutz S, Janke M, Kirchhoff D, Jung U, Patzel V, Vogel U, Rudel T, Andreou I, Weber M, Scheffold A. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2008 Sep;38(9):2616-25.
131. Marcus N, Takada H, Law J, Cowan MJ, Gil J, Regueiro JR, Lopez-Granados E, Dalal J, Friedrich W, Manfred H, Grunebaum E, Hanson C, Shearer WT and Roifman CM. Haematopoietic Stem Cell Transplantation for CD38 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jul 12.
132. Martelli MP, Lin H, Zhang W, Samelson LE, Bierer BE. Signaling via LAT (linker for T-cell activation) and Syk/ZAP70 is required for ERK activation and NFAT transcriptional activation following CD2 stimulation. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2181-90.
133. Matheux F, Ikinciogullari A, Zapata DA, Barras E, Zufferey M, Dogu F, Regueiro JR, Reith W, Villard J. Direct genetic correction as a new method for diagnosis and molecular characterization of MHC class II deficiency. *Mol Ther*. 2002 Dec;6(6):824-9.
134. McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J, Sharp PA. Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5754-60.
135. Meinel E, Hohlfeld R, Wekerle H, Fleckenstein B. immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri. *Immunol Today*. 1995 Feb;16(2):55-8. Review.
136. Methi T, Ngai J, Mahic M, Amarzguoui M, Vang T, Tasken K. Short-interfering RNA-mediated Lck knockdown results in augmented downstream T cell responses. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7398-406.
137. Mittrücker HW, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B. CD2-mediated autocrine growth of herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992 Sep 1;176(3):909-13.
138. Mittrücker HW, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B. Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int Immunol*. 1993 Aug;5(8):985-90.
139. Molano A, Park SH, Chiu YH, Nosseir S, Bendelac A, Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):5005-9.
140. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature*. 1992 Nov 19;360(6401):225-31.
141. Moreno M, Molling JW, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Bontkes HJ. In vitro expanded human invariant natural killer T-cells promote functional activity of natural killer cells. *Clin Immunol*. 2008 Oct;129(1):145-54.
142. Morgan NV, Goddard S, Cardno TS, McDonald D, Rahman F, Barge D, Ciupek A, Straatman-Iwanowska A, Pasha S, Guckian M, Anderson G, Huissoon A, Cant A, Tate WP, Hambleton S and Maher ER. Mutation in the TCR $\alpha$  subunit constant gene (*TRAC*) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCR $\alpha\beta$  T cells. *J.Clin.Invest*. 2011 (121) 695-702.
143. Morley BJ, Chin KN, Newton ME, Weiss A. The lysine residue in the membrane-spanning domain of the beta chain is necessary for cell surface expression of the T cell antigen receptor. *J Exp Med*. 1988 Dec 1; 168(6):1971-8.
144. Mustelin T, Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J*. 2003 Apr 1;371(Pt 1):15-27. Review.
145. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):229-39. Review.
146. Ohashi PS, Mak TW, Van den Elsen P, Yanagi Y, Yoshikai Y, Calman AF, Terhorst C, Stobo JD, Weiss A. Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature*. 1985 Aug 15-21;316(6029):606-9.
147. O'Reilly LA, Kruse EA, Puthalakath H, Kelly PN, Kaufmann T, Huang DC, Strasser A. MEK/ERK-

- mediated phosphorylation of Bim is required to ensure survival of T and B lymphocytes during mitogenic stimulation. *J Immunol.* 2009 Jul 1;183(1):261-9.
148. Paccani SR, Boncristiano M, Patrussi L, Ulivieri C, Wack A, Valensin S, Hirst TR, Amedei A, Del Prete G, Telford JL, D'Elis MM, Baldari CT. Defective Vav expression and impaired F-actin reorganization in a subset of patients with common variable immunodeficiency characterized by T-cell defects. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):626-34. Epub 2005 Apr 7.
149. Pacheco-Castro A, Alvarez-Zapata D, Serrano-Torres P and Regueiro JR. Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998 (161) 3152-3160.
150. Pan Q, Brodeur JF, Drbal K, Dave VP. Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice. *Mol Immunol.* 2006 Apr;43(11):1741-50.
151. Pan Q, Gollapudi AS, Dave VP. Biochemical evidence for the presence of a single CD3delta and CD3gamma chain in the surface T cell receptor/CD3 complex. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51068-74.
152. Penninger JM, Crabtree GR. The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell.* 1999 Jan 8;96(1):9-12.
153. Perez OD, Mitchell D, Campos R, Gao GJ, Li L, Nolan GP. Multiparameter analysis of intracellular phosphoepitopes in immunophenotyped cell populations by flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2005 .May;Chapter 6:Unit 6.20.
154. Pérez-Aciego P, Alarcón B, Arnaiz-Villena A, Terhorst C, Timón M, Segurado OG, Regueiro JR. Expression and function of a variant T cell receptor complex lacking CD3-gamma. *J. Exp. Med.* 1991 (174) 319-326.
155. Pérez-Flores V, Guardo AC, Rossi NE, Recio MJ, Reiné J, Regueiro JR. El complejo TCR/CD3: Especificidad con flexibilidad. *Inmunología.* 2006 Enero-Marzo;1(25):50-56
156. Perfettini JL, Nardacci R, Bourouba M, Subra F, Gros L, Séror C, Manic G, Rosselli F, Amendola A, Masdehors P, Chessa L, Novelli G, Ojcius DM, Siwicki JK, Chechlinska M, Auclair C, Regueiro JR, de Thé H, Gougeon ML, Piacentini M, Kroemer G. Critical involvement of the ATM-dependent DNA damage response in the apoptotic demise of HIV-1-elicited syncytia. *PLoS One.* 2008 Jun 18;3(6):e2458.
157. Pitcher LA and van Oers NS. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM? *Trends Immunol.* 2003 (24) 554-560.
158. Pitcher LA, Mathis MA, Young JA, DeFord LM, Purdie B, Wulfig C, van Oers NS. The CD3 gamma epsilon/delta epsilon signaling module provides normal T cell functions in the absence of the TCR zeta immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Eur J Immunol.* 2005 Dec;35(12):3643-54.
159. Rao A. Signaling to gene expression: calcium, calcineurin and NFAT. *Nat Immunol.* 2009 Jan;10(1):3-5.
160. Rauch J, Gumperz J, Robinson C, Sköld M, Roy C, Young DC, Lafleur M, Moody DB, Brenner MB, Costello CE, Behar SM. Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):47508-15.
161. Ravichandran KS, Lee KK, Songyang Z, Cantley LC, Bum P and Burakoff SJ. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science.* 1993. 262:902-905.
162. Recio MJ, Moreno-Pelayo MA, Kilic SS, Guardo AC, Sanal O, Allende LM, Perez-Flores V, Mencia A, Modamio-Hoybjør S, Seoane E and Regueiro JR. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J.Immunol.* 2007 (178) 2556-2564.
163. Recio MJ, Reiné J, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. CD3D. Targeted Proteins Database 1, [21703], 10.2970/tpdb.2008.172.

164. Regueiro JR, Arnaiz-Villena A, Ortiz de Landázuri M, Martín Villa JM, Vicario JL, Pascual-Ruiz V, Guerra-García F, Alcamí J, López-Botet M, Manzanares J. Familial defect of CD3 (T3) expression by T cells associated with rare gut epithelial cell autoantibodies. *Lancet*. 1986 May 31;1(8492):1274-5.
165. Reiné J, Busto EM, Muñoz-Ruiz M, Rossi NE, Rodríguez-Fernández JL, Martínez-Naves E, Regueiro JR, Recio MJ. *Cellular Immunology*. 271 (2011) 62-66.
166. Rieux-Laucat F., Hivroz C., Lim A., et al. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N.Engl.J.Med.* 354 (2006) 1913-1921.
167. Rivero-Carmena M, Porras O, Pelaez B, Pacheco-Castro A, Gatti RA, Regueiro JR. Membrane and transmembrane signaling in Herpesvirus saimiri-transformed human CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes is ATM-independent. *Int Immunol*. 2000 Jun;12(6):927-35.
168. Roberts JL, Lauritsen JP, Cooney M, Parrott RE, Sajaroff EO, Win CM, Keller MD, Carpenter JH, Carabana J, Krangel MS, Sarzotti M, Zhong XP, Wiest DL and Buckley RH.  $\bar{T}B+NK+$  severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood*. 2007 (109) 3198-3206.
169. Rodríguez-Gallego C, Corell A, Pacheco A, Timón M, Regueiro JR, Allende LM, Madroño A, Arnaiz-Villena A. Herpes virus saimiri transformation of T cells in CD3 gamma immunodeficiency: phenotypic and functional characterization. *J Immunol Methods*. 1996 Nov 13;198(2):177-86.
170. Roifman CM. CD3 delta immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Dec;4(6):479-84. Review.
171. Rossi NE, Reiné J, Pineda-Lezami M, Pulgar M, Meza NW, Swamy M, Risueno R, Schamel WW, Bonay P, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. Differential antibody binding to the surface alphabetaTCR.CD3 complex of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. *Int Immunol*. 2008 Oct;20(10):1247-58.
172. Rubin B, Alibaud L, Huchenq-Champagne A, Arnaud J, Toribio ML, Constans J. Some hints concerning the shape of T-cell receptor structures. *Scand J Immunol*. 2002 Feb;55(2):111-8. Review.
173. Rutella S, Rumi C, Lucia MB, Barberi T, Puggioni PL, Lai M, Romano A, Cauda R, Leone G. Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry*. 1999 Jun 15;38(3):95-101.
174. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science*. 1994 Nov 18;266(5188):1208-12.
175. Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:371-94. Epub 2001 Oct 4. Review.
176. Sanal O, Yel L, Ersoy F, Tezcan I and Berkel AI. Low expression of the T-cell receptor - CD3 complex: a case with a clinical presentation resembling humoral immunodeficiency. *Turk.J.Pediatr*. 1996 (38) 81-84.
177. Secrist JP, Burns LA, Karnitz L, Koretzky GA, Abraham RT. Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem*. 1993 .Mar 15;268(8):5886-93.
178. Shores E.W. and Love P.E. TCR zeta chain in T cell development and selection. *Curr.Opin.Immunol*. 9 (1997) 380-389.
179. Siegers GM, Swamy M, Fernández-Malavé E, Minguet S, Rathmann S, Guardo AC, Pérez-Flores V, Regueiro JR, Alarcón B, Fisch P, Schamel WW. Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. *J Exp Med*. 2007 Oct 29;204(11):2537-44.

180. Siggs OM, Makaroff LE, Liston A. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol.* 2006 Apr;18(2):175-83. Review.
181. Sommers CL, Dejarnette JB, Huang K, Lee J, El Khoury D, Shores EW and Love PE. Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development. *J.Exp.Med.* 2000 (192) 913-919.
182. Soudais C, Villartay JP, Deist FL, Fischer A and Lisowska-Groszpiere B. Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat.Genet.* 1993 (3) 77-81.
183. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76.
184. Steele EJ, Rothenfluh HS, Ada GL, Blanden RV. Affinity maturation of lymphocyte receptors and positive selection of T cells in the thymus. *Immunol Rev.* 1993 Oct;135:5-49. Review.
185. Straus DB, Weiss A. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med.* 1993 Nov 1;178(5):1523-30.
186. Su Z, Wang H, Wan Y, Bi Z. In vitro preparation and characterization of the human CD3 epsilon epsilon homodimer and CD3 epsilon gamma and CD3 epsilon delta heterodimers.. *Int J Mol Med.* 2009 Oct;24(4):437-44.
187. Sun ZY, Kim ST, Kim IC, Fahmy A, Reinherz EL, Wagner G. Solution structure of the CD3epsilon delta ectodomain and comparison with CD3epsilon gamma as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 30;101(48):16867-72.
188. Sussman, JJ, JBonifacio JS, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Saito T, Klausner RD, Ashwell JD.. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell.* 1988 52(1): 85-95.
189. Swamy M, Minguet S, Siegers GM, Alarcón B, Schamel WW. A native antibody-based mobility-shift technique (NAMOS-assay) to determine the stoichiometry of multiprotein complexes. *J Immunol Methods.* 2007 Jul 31;324(1-2):74-83.
190. Szymczak AL, Vignali DA. Plasticity and rigidity in adaptor protein-2-mediated internalization of the TCR:CD3 complex. *J Immunol.* 2005 Apr 1;174(7):4153-60.
191. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol.* 2004 May;22(5):589-94.
192. Takada H, Nomura A, Roifman CM and Hara T. Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur.J. Pediatr.* 2005 (164) 311-314.
193. Thomassen EA, Dekking EH, Thompson A, Franken KL, Sanal O, Abrahams JP, van Tol MJ, Koning F. The impact of single amino acid substitutions in CD3gamma on the CD3epsilon gamma interaction and T-cell receptor-CD3 complex formation. *Hum Immunol.* 2006 Aug;67(8):579-88.
194. Torres PS, Alcover A, Zapata DA, Arnaud J, Pacheco A, Martín-Fernández JM, Villasevil EM, Sanal O, Regueiro JR. TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):5947-55.
195. Torres PS, Zapata DA, Pacheco-Castro A, Rodriguez-Fernandez JL, Cabanas C and Regueiro JR. Contribution of CD3 gamma to TCR regulation and signaling in human mature T lymphocytes. *Int.Immunol.* 2002 (14) 1357-1367.
196. Touma M, Sun ZY, Clayton LK, Marissen WE, Kruisbeek AM, Wagner G, Reinherz EL. Importance of the CD3gamma ectodomain terminal beta-strand and membrane proximal stalk in thymic development and receptor assembly. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3668-79.
197. Tskvitaria-Fuller I, Rozelle AL, Yin HL, Wülfing C. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol.* 2003 .Sep 1;171(5):2287-95.

198. Tunnacliffe A, Buluwela L, Rabbitts TH. Physical linkage of three CD3 genes on human chromosome 11. *EMBO J*. 1987 Oct;6(10):2953-7.
199. von Boehmer H, Teh HS, Kisielow P. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol Today*. 1989 Feb;10(2):57-61. Review.
200. von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol*. 2004;84:201-38. Review.
201. von Boehmer H. Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jul;5(7):571-7.
202. von Essen M, Menné C, Nielsen BL, Lauritsen JP, Dietrich J, Andersen PS, Karjalainen K, Ødum N, Geisler C. The CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4519-23.
203. Wang B, Wang N, Salio M, Sharpe A, Allen D, She J, Terhorst C. Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alphabeta and gammadelta T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998 Oct 5;188(7):1375-80.
204. Weber F, Meinel E, Drexler K, Czlonkowska A, Huber S, Fickenscher H, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Wekerle H, Hohlfeld R. Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11049-53.
205. Wegener AM, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, Malissen B. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell*. 1992 Jan 10;68(1):83-95.
206. Weiss A and Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994 . (76) 263-274.
207. Wiese N, Tsygankov AY, Klauenberg U, Bolen JB, Fleischer B, Bröker BM. Selective activation of T cell kinase p56lck by Herpesvirus saimiri protein tip. *J Biol Chem*. 1996 Jan 12;271(2):847-52.
208. Yasukawa M, Inoue Y, Kimura N, Fujita S. Immortalization of human T cells expressing T-cell receptor gamma delta by herpesvirus saimiri. *J Virol*. 1995 Dec;69(12):8114-7.
209. Yin J, Ma Z, Selliah N, Shivers DK, Cron RQ, Finkel TH. Effective gene suppression using small interfering RNA in hard-to-transfect human T cells. *J Immunol Methods*. 2006 May 30;312(1-2):1-11.
210. Yssel H, de Waal Malefyt R, Duc Dodon MD, Blanchard D, Gazzolo L, de Vries JE, Spits H. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. *J Immunol*. 1989 Apr 1;142(7):2279-89.
211. Zapata DA, Pacheco-Castro A, Torres PS, Ramiro AR, San José E, Alarcón B, Alibaud L, Rubin B, Toribio ML and Regueiro JR. Conformational and biochemical differences in the TCR.CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J Biol Chem*. 1999 (274) 35119-35128.
212. Zapata DA, Schamel WW, Torres PS, Alarcón B, Rossi NE, Navarro MN, Toribio ML and Regueiro JR. Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor.CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 2004 (279) 24485-22492.
213. Zhang W, Tribble RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. 1998 Aug;9(2):239-46.
214. Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Levery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*. 2004 Dec 3;306(5702):1786-9. Epub 2004 Nov 11.



## El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad

V. Pérez-Flores\*, A.C. Guardo\*, N.E. Rossi\*, M.J. Recio, J. Reiné, J.R. Regueiro

*Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.*

*\*Contribución equivalente.*

### TCR/CD3 COMPLEX: SPECIFICITY WITH FLEXIBILITY

#### RESUMEN

En los últimos años se han publicado trabajos que modifican nuestra percepción de la estructura y la función del complejo TCR/CD3. Repasamos aquí su estequiometría, valencia, topología y variabilidad conformacional, así como los cambios que sufre tras encontrar a su antígeno y el papel específico de cada cadena CD3 en todo ello. El TCR/CD3 sorprende por su flexibilidad, que sin embargo no impide su exquisita especificidad.

**PALABRAS CLAVE:** TCR / Linfocito T / CD3 / Cambio conformacional / Glicosilación / Inmunodeficiencia.

#### ABSTRACT

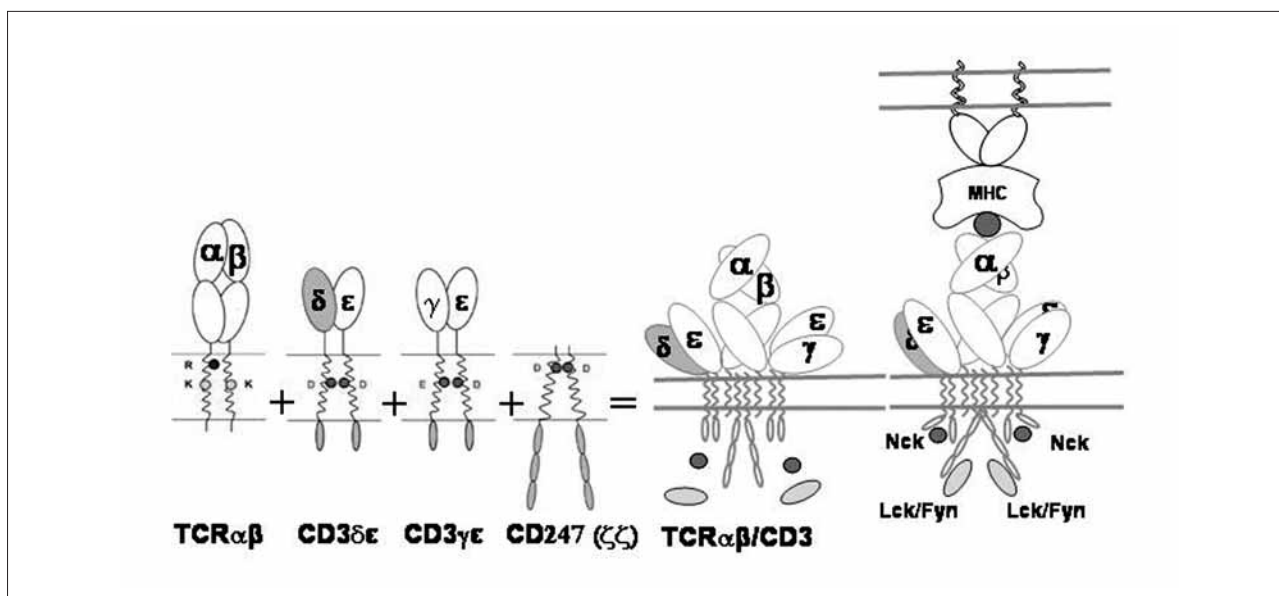
In the last few years several publications have changed our perception of the structure and function of the TCR/CD3 complex. We review here its stoichiometry, valence, topology and conformational variability, together with the conformational changes that take place after ligand engagement, and the specific role of each CD3 chain in these features. Despite its surprising flexibility, the TCR/CD3 complex endows T cells with an exquisite specificity.

**KEY WORDS:** TCR / T lymphocyte / CD3 / Conformational change / Glycosylation / Immunodeficiency.

#### INTRODUCCIÓN

El receptor clonotípico de las células T (TCR) es un complejo formado por un heterodímero ( $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ) responsable del reconocimiento antigénico, a menudo en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad (MHC), y una serie de cadenas invariantes de función y estequiometría aún inciertas: CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) y CD247 ( $\zeta$ ). El TCR es crucial en dos momentos de la vida de los linfocitos T. Participa primero en la selección positiva y negativa del repertorio T durante la maduración tímica. Después, en la periferia, es responsable del reconocimiento de antígenos, y desencadena programas funcionales que expanden y diferencian a los clones relevantes en cada caso. Las cadenas invariantes tienen en ambos momentos un difícil papel: deben ser

capaces de acompañar primero hasta la membrana, y ayudar después a señalar con exquisita precisión, a heterodímeros  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  diversos cuya estructura exacta es por tanto impredecible en cada célula, algo que no sucede con ningún otro receptor de membrana salvo el BCR. De hecho las mutaciones *missense* que generan sitios ectópicos de glicosilación alteran gravemente la función de otros receptores más sencillos<sup>(1)</sup>. Además, y de nuevo a diferencia de otros receptores, el TCR debe ser capaz de distinguir su escaso ligando entre miles de antígenos similares pero irrelevantes, y ello a pesar de su pobre afinidad. Varios artículos y revisiones recientes arrojan luz sobre aspectos estructurales y funcionales de este interesante complejo, algunos con importantes aplicaciones potenciales.



**Figure 1.** Cuatro dímeros distintos (izquierda) se asocian en el orden indicado para constituir el complejo TCRαβ/CD3 de los linfocitos T (derecha). Las interacciones polares transmembrales son cruciales para su ensamblaje<sup>(11)</sup>. El reconocimiento de antígeno induce cambios conformacionales que permitirían el reclutamiento propuesto de proteínas implicadas en señalización (Nck, Lck...)<sup>(12)</sup>.

## ESTRUCTURA

### Estequiometría

#### TCRαβ

Los últimos trabajos indican que la estequiometría mínima más probable del TCRαβ/CD3 es αβ/δεγεζζ, que se ensamblaría por dímeros en ese orden (Fig. 1)<sup>(2)</sup>. Aunque originalmente se describió que para la expresión de un complejo TCR/CD3 era necesaria la participación de todas las cadenas<sup>(3)</sup>, en células no T (Hela, 3T3) se observó que es posible la expresión en membrana de complejos sin CD3δ o CD3γ, pero no sin CD3ε, ζ, TCRα o TCRβ, tanto en humanos<sup>(4)</sup> como en ratón<sup>(5)</sup>; Vignali, comunicación personal). Este hecho también se ha observado en los propios linfocitos T, tanto humanos como de ratón, deficientes de alguna de esas cadenas<sup>(6-8)</sup>. En la figura 2 (arriba) se indican las posibles estequiometrías de los complejos incompletos. Por tanto, los mutantes de la línea celular Jurkat que carecen de CD3γ (JGN<sup>(9)</sup>), seleccionados en base a la falta de expresión en superficie del TCR/CD3, no son útiles para definir el papel biológico de dicha cadena en la regulación del complejo<sup>(10)</sup>.

#### TCRγδ

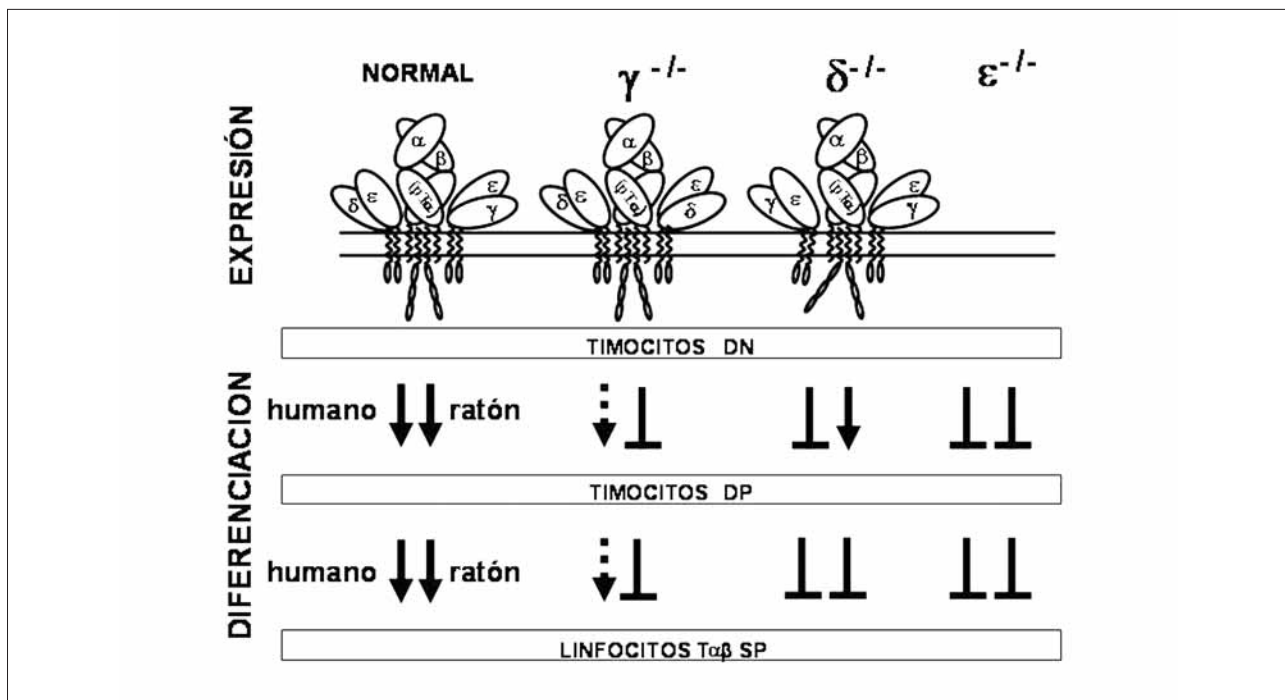
Curiosamente, el complejo TCRγδ/CD3 carece en ratón de la cadena CD3δ y tiene la estequiometría γδ/εδεδζζ, aunque una de las cadenas CD3γ presenta glicosilación

diferencial, sobre todo tras la activación, que la acerca al peso aparente de CD3δ (Fig. 3, arriba)<sup>(13)</sup>. Esto permite explicar por qué el TCR y el desarrollo de los linfocitos T γδ no se ven afectados en ratones δ<sup>-/-</sup><sup>(14)</sup>. Aunque en ese momento se propuso una estructura similar para el TCRγδ/CD3 humano, datos recientes sugieren que éste debe tener una estequiometría similar a la del TCRαβ/CD3. Así, los humanos sin CD3δ carecen de linfocitos T γδ<sup>(15)</sup>. Sin embargo, los humanos sin CD3γ tienen números casi normales que además expresan más CD3 que los linfocitos T αβ<sup>(16)</sup>, Guardo et al. resultados no publicados). Además, la cadena TCRδ humana, como ocurre con TCRβ, puede asociarse a los dímeros CD3γε o δε<sup>(17)</sup>. Estos datos apoyan la estequiometría γδ/δεγεζζ para las células Tγδ humanas, parecida por tanto a la de los linfocitos Tαβ humanos (Fig. 3, abajo).

### Valencia y topología

El TCR tiene alta sensibilidad a pesar de su baja afinidad. Esto es, debe detectar su antígeno nominal a pesar de su escasa afinidad por él y de la presencia de multitud de antígenos potenciales muy parecidos. Además, *in vitro* se observa que los linfocitos T pueden responder de manera proporcionada a dosis crecientes del antígeno en escala logarítmica. Esta paradoja ha encontrado una posible explicación recientemente: se ha observado que el TCR puede oligomerizar en la membrana en nanoagregados de entre 10 y 20 unidades con la estequiometría de la figura 1<sup>(18)</sup>. Es





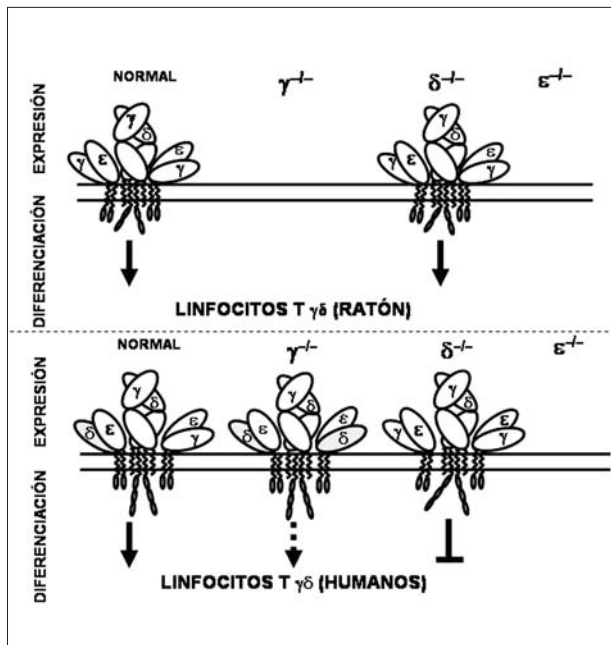
**Figure 2.** Estequiometría propuesta para el TCRαβ (y el preTCRαβ) en condiciones normales y en ausencia de distintas cadenas CD3 (arriba), y efectos diferenciales observados en el desarrollo linfóide T en humanos vs ratón (abajo). Clave: → selección normal, .....→ selección parcial, —| bloqueo. DN, doble negativas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), DP, doble positivas (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), SP, simple positivas (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>).

decir, coexisten TCR monovalentes y multivalentes (Fig. 4). La multivalencia, como ocurre con las inmunoglobulinas, permite utilizar el concepto de avidéz para la interacción TCR/antígeno, que puede ser así mucho más firme que lo esperado de su escasa afinidad monovalente<sup>(19)</sup>. Esta topología presentaría además otra ventaja: la capacidad de amplificar la pequeña señal de activación inicial mediante un mecanismo hipotético por el cual los TCR de un mismo nanoagregado verían facilitada su participación en la señalización al estar cerca de los que reconocen el antígeno, simplemente por su afinidad intrínseca por MHC. Para ello el ligando debe ser también multivalente, lo cual parece posible en el caso del MHC<sup>(20)</sup>. En este modelo, los TCR monovalentes sólo serían activados a altas concentraciones de antígeno, de manera que tendrían un papel en la inducción de la respuesta inmune únicamente cuando la activación de los receptores multivalentes estuviera saturada, y explicaría el enorme rango de capacidad de respuesta de los linfocitos T indicado anteriormente. Este sería el caso del reconocimiento de autoantígenos en las enfermedades autoinmunitarias, lo que sugiere posibles aplicaciones terapéuticas.

### Conformación

Todas las cadenas del TCR/CD3, salvo CD3ε y ζ, están glicosiladas. Entre el 20 y el 30% de la masa molecular

aparente de cada monómero de TCR/CD3 se debe a la glicosilación. Como una buena parte de las cadenas CD3 es intracelular, los glicanos unidos a la porción extracelular tienen proporcionalmente un impacto aún mayor en la conformación final externa del complejo (Fig. 5). Por ejemplo, hay anticuerpos monoclonales específicos de CD3 que no reconocen el TCRγδ/CD3 a no ser que sea previamente desglicosilado (como el WT31)<sup>(21)</sup>. Por otro lado, la simple activación de los linfocitos Tγδ puede modificar la glicosilación de CD3γ con efectos bioquímicos tan conspicuos que durante años se confundió con CD3δ<sup>(14)</sup>. Sin embargo, se acepta que la composición y estructura del complejo TCRαβ/CD3 es idéntica para los linajes CD4<sup>+</sup> (Th) y CD8<sup>+</sup> (Tc). Por eso las diferencias de tinción observadas con anticuerpos monoclonales frente al TCRαβ/CD3 entre ambos linajes se achacaban a diferencias cuantitativas<sup>(22)</sup>. Pero la falta de CD3γ<sup>(8,23)</sup> o δ<sup>(7)</sup> resultó afectar más a la expresión del complejo en linfocitos Tc que en Th. Además, nuestro grupo describió diferencias conformacionales y bioquímicas inesperadas en el TCR/CD3 entre ambos linajes en ausencia de CD3γ<sup>(24)</sup>. Esto nos llevó a analizar linfocitos Tαβ normales, y los resultados indican que existen diferencias conformacionales específicas de linaje también en el complejo TCR/CD3 de los linfocitos Tαβ CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos<sup>(25)</sup> y no humanos (ratón y primates, Rossi



**Figure 3.** Estequiometría propuesta para el TCRγδ en condiciones normales y en ausencia de distintas cadenas CD3, y su impacto en el desarrollo linfocitario γδ en humanos (abajo), y en ratón (arriba).

et al, resultados no publicados, Fig. 5). Dichas diferencias parecen debidas a la glicosilación diferencial de ambos linajes. En todo caso las diferencias en el TCRαβ/CD3 entre linfocitos Th y Tc pueden ser importantes para las interacciones en cis durante el reconocimiento antigénico y la transducción de señales<sup>(26, 27)</sup>, y podrían tener aplicación terapéutica (anticuerpos monoclonales anti-TCR/CD3 linaje-específicos<sup>(28)</sup>).

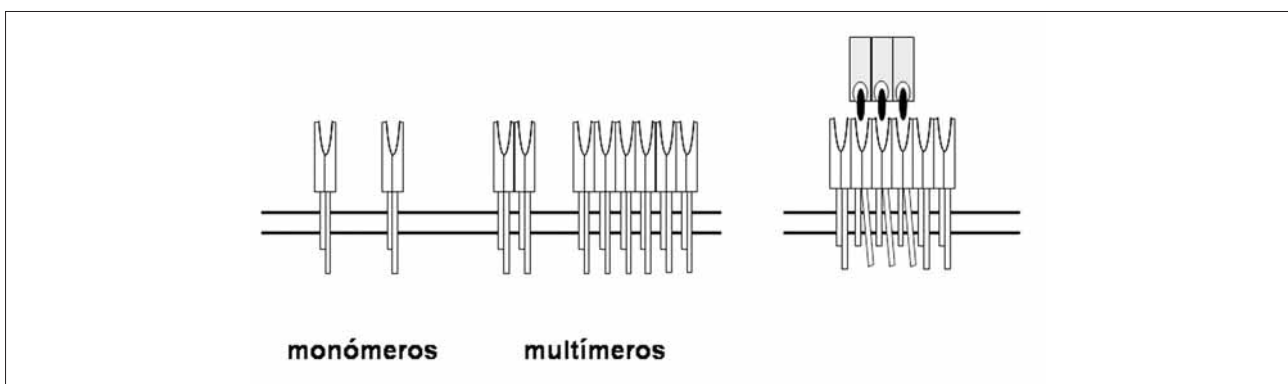
No sólo la glicosilación es fuente de variabilidad conformacional extracelular. También se ha descrito que ciertos TCR/CD3 pueden sufrir diferentes grados de

degradación proteolítica en CD3ε, lo que modifica su reconocimiento por anticuerpos monoclonales anti-CD3<sup>(29)</sup>.

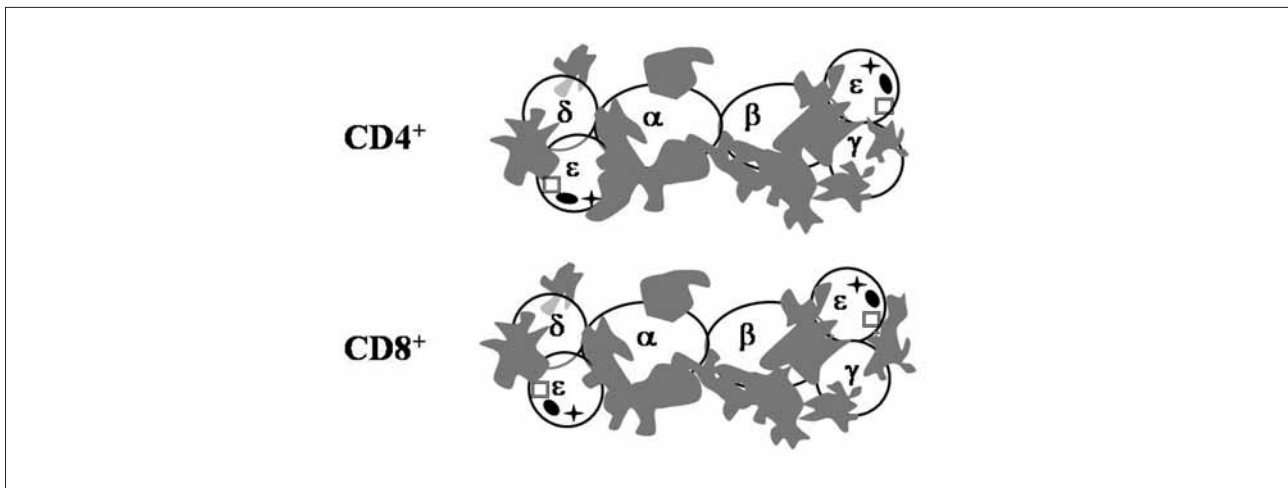
## FUNCIÓN

### Señalización por cambio conformacional

Estudios recientes han demostrado que la unión del ligando al TCR/CD3 induce un cambio conformacional tanto fuera como dentro de la membrana plasmática. Una de las consecuencias medibles es que se expone una secuencia de la porción intracelular de CD3ε rica en prolina (Fig. 1)<sup>(12)</sup>. Dicha secuencia podría reclutar entonces a la ubicua proteína adaptadora Nck, aunque otros autores opinan que el reclutamiento es en realidad indirecto<sup>(30)</sup>. Este evento tiene lugar independientemente y con anterioridad a la activación de las tirosín quinasas de la familia Src. Nck no forma parte del TCR, y de hecho está implicada en la señalización a través de otros receptores de superficie. Nck sólo se reclutaría después del cambio conformacional del complejo TCR/CD3. A su vez, el reclutamiento de Nck parece necesario para una correcta señalización, maduración de la sinapsis inmunológica y activación de la célula T<sup>(12)</sup>, y tiene lugar también durante la selección positiva y negativa en el timo<sup>(31)</sup>. Otros autores, sin embargo, argumentan que la ablación de la secuencia de prolina de CD3ε, que impide dicho reclutamiento (aunque quizá no el cambio conformacional), no parece afectar al desarrollo y función de las células T policlonales *in vivo*<sup>(32)</sup>. Por cierto, son los mismos que proponen también un cambio conformacional, pero en la cadena ζ<sup>(33)</sup>. Por último, se ha sugerido mediante cálculos termodinámicos que la multivalencia y el cambio conformacional podrían explicar la enorme especificidad del reconocimiento antigénico (Fig. 4 derecha)<sup>(19)</sup>. Otros, en cambio, habían sugerido que es la activación consecutiva de varios TCR monovalentes



**Figure 4.** Los monómeros y los multímeros del TCR coexisten en la superficie celular (izquierda). Los multímeros aumentan la especificidad y la afinidad (avidez, en ese caso) del reconocimiento, y merced al cambio conformacional permitirían definir un umbral de activación (derecha). Adaptado de 18 y 19.

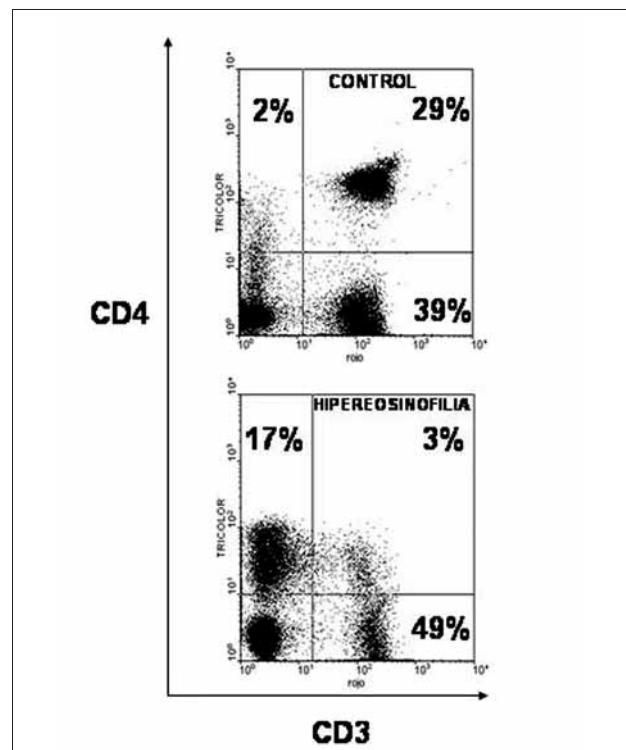


**Figure 5.** Modelo hipotético sobre las diferencias de glicosilación del complejo TCR $\alpha\beta$ /CD3 entre linajes Th y Tc. Los glicanos (en gris) de las diversas cadenas pueden ser diferentes en composición o tamaño, ya que 1) diversas lectinas se unen mejor a linfocitos Tc que Th, 2) algunas de ellas compiten con ciertos monoclonales anti-CD3 (OKT3, SK7) de manera linaje-específica, y 3) a diferencia de éstos, algunos monoclonales (RW28C8) se unen mejor a Tc que a Th. Para modelizar estas diferencias, se indican los sitios de unión de los monoclonales y su posible interferencia por glicanos linaje-específicos: SK7 (cuadrado), OKT3 (óvalo) y RW28C8 (asterisco).

por un único ligando la responsable de la activación final de la célula T, que así podría «contar» los ligandos disponibles<sup>(34)</sup>. En todo caso, los cambios en el exterior de la célula que preceden a los intracelulares son aún más discutidos, aunque se acepta el papel central de los dímeros CD3<sup>(35)</sup>.

#### ¿Por qué tantas cadenas invariantes?

Un viejo problema en el estudio del papel biológico de cada cadena invariante del TCR/CD3 (y del preTCR/CD3) es que si su papel estructural es crítico, no podremos saber cuál es su contribución a la señalización por la sencilla razón de que no habrá complejo que analizar. Ese parece ser el caso de las cadenas CD3 $\epsilon$  y  $\zeta$  para las tres formas del TCR/CD3 ( $\alpha\beta$ , preT $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ) en humanos y ratón (Fig. 2), y también el de CD3 $\gamma$  para el TCR $\gamma\delta$  de ratón. Pero en los demás casos parece que el problema principal no es la expresión, sino la señalización. Así, la cadena CD3 $\gamma$  parece crucial en ratón, pero no en humanos, para la diferenciación de los linfocitos T  $\alpha\beta$  (Fig. 2 y 3). En cambio CD3 $\delta$  es más importante en humanos que en ratón para la producción de linfocitos T  $\gamma\delta$  y para el paso de timocitos DN a DP en el linaje  $\alpha\beta$  (una función del preT $\alpha\beta$ ). Por tanto, a pesar de su notable homología, CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  contribuyen de manera muy distinta a la señalización del TCR/CD3 (y el preTCR/CD3), y además lo hacen de manera diferente en humanos y en ratón. De hecho, en el ratón doble *knockout*  $\gamma^{-/-}\delta^{-/-}$ <sup>(36)</sup>, la introducción de la cadena CD3 $\delta$  humana, pero no la de ratón, restaura la señalización a través del pre-



**Figure 6.** Inmunofenotipo de un caso de hipereosinofilia idiopática en la que se observa una subpoblación Th (CD4<sup>+</sup>) que presenta un defecto adquirido en la expresión de CD3.

TCR/CD3 y el TCR $\alpha\beta$ /CD3<sup>(37)</sup>, Edgar Fernandez-Malavé, comunicación personal). Por tanto, la cadena CD3 $\delta$  humana

parece poseer una capacidad de señalización que mimetiza a la de CD3 $\gamma$  de ratón.

Nuestros resultados relativos a la expresión de quimeras de CD3 $\gamma$  y  $\delta$  en linfocitos humanos primarios  $\gamma^{-/-}$  (Guardo AC et al. resultados no publicados) sugieren que la cadena CD3 $\gamma$  contribuye a una mejor conformación del TCR $\alpha\beta$ /CD3, quizá facilitando su ensamblaje o su transporte a la membrana.

## DISFUNCIONES

Además de las deficiencias congénitas ya descritas, el espectro de las deficiencias de CD3 crece cada año. Entre las congénitas, hay aún sin publicar una de  $\zeta^{(38)}$  parcial y muy compleja: linfopenia T selectiva, hiper-IgG, A y M pero sin respuesta específica de anticuerpos, proliferación a mitógenos normal, y una mutación C>T en el 2º codón del primer ITAM que impide la expresión del TCR en casi todos los linfocitos, salvo en algunos CD4 $^{+}$  en los que revierte por mutaciones diversas en una posición posterior (*¿hot spot de mutaciones?*), lo cual restaura *in vivo* la expresión del TCR. Y se ha descrito un caso en Holanda con defecto de expresión de TCR/CD3 y clínica grave, pero sin mutaciones en las cadenas invariantes<sup>(39)</sup>. Hay también deficiencias adquiridas de CD3. La más notable es la de  $\zeta$ , que podría ser un mecanismo para reducir la respuesta inmunitaria T en patologías de corte inflamatorio asociadas a autoinmunidad, infección o incluso cáncer<sup>(40)</sup>. Otra es la hipereosinofilia idiopática linfocítica, que se asocia a hiper-IgG, A, M y E y a una expansión de linfocitos Th2 que carecen de CD3 (Fig. 6) y que apenas responden a mitógenos<sup>(41)</sup>. Naturalmente, el estudio de las deficiencias congénitas ayudará a entender las adquiridas.

## AGRADECIMIENTOS

Financiado en parte por el MEC (BFU2005-01738, BMC2002-03247, beca de VPF), la CAM (GR/SAL/0570/2004, beca de JR) y la Universidad Complutense de Madrid (beca de ACG). Agradecemos a Diana Gil (UCM) y a Edgar Fernández-Malavé y Ruth M. Risueño (CBM, CSIC) sus comentarios, y a Luis Allende (Hospital 12 de Octubre), Ozden Sanal (Ankara, Turquía) y Sara Kiliç (Bursa, Turquía) su continua colaboración científica.

### CORRESPONDENCIA:

Dr. José R. Regueiro

Inmunología

Facultad de Medicina

Universidad Complutense

28040 Madrid

Phone: +34 91 394 16 42. Fax: +34 91 394 16 41

E-mail: regueiro@med.ucm.es

## BIBLIOGRAFÍA

1. Vogt G, Chappier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, et al. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet* 2005; 37:692-700.
2. Call ME, Wucherpfennig KW. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu Rev Immunol* 2005;23:101-125.
3. Ohashi PS, Mak TW, Van den Elsen P, Yanagi Y, Yoshikai Y, Calman AF, et al. Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature* 1985; 316:606-609.
4. Kappes DJ, Tonegawa S. Surface expression of alternative forms of the TCR/CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10619-10623.
5. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 2004; 22:589-594.
6. Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez-Aciego P, Martin-Villa JM, Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3 $\gamma$  subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med*. 1992; 327:529-33.
7. Dave VP, Cao Z., Browne C, Alarcon B, Fernandez-Miguel G, Lafaille J, et al. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J* 1997; 16:1360-1370.
8. Haks MC, Krimpenfort P, Borst J, Kruisbeek AM. The CD3 $\gamma$  chain is essential for development of both the TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  lineages. *EMBO J* 1998;17: 1871-82
9. von Essen M, Menne C, Nielsen BL, Lauritsen JP, Dietrich J, Andersen PS, et al. The CD3 gamma leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J Immunol* 2002 ;168:4519-4523.
10. Torres PS, Alcover A, Zapata DA, Arnaud J, Pacheco A, Martin-Fernandez JM, et al. TCR dynamics in human mature T lymphocytes lacking CD3 gamma. *J Immunol* 2003;170:5947-5955.
11. Call ME, Wucherpfennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol* 2004; 40:1295-1305.
12. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 2002; 109:901-912.
13. Hayes SM, Love PE. Stoichiometry of the murine  $\gamma\delta$  T cell receptor. *J Exp Med* 2006; 203(1):47-52.
14. Hayes SM, Laky K, El-Khoury D, Kappes DJ, Fowlkes BJ, Love PE. Activation-induced modification in the CD3 complex of the  $\gamma\delta$  T cell receptor. *J Exp Med* 2002; 196:1355-1361. Erratum in: *J Exp Med* 196:1653.
15. Dadi HK, Simon AJ, Roifman CM. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *New Eng J Med* 2003; 349:1821-1828.
16. Recio MJ, Moreno- Pelayo MA, Kiliç SS, Guardo AC, Sanal O, Allende L, et al. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. 2006 (Submitted).
17. Alibaud L, Arnaud J, Llobera R, Rubin B. On the role of CD3delta chains in TCRgammadelta/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand J Immunol* 2001; 54:155-162.



18. Schamel WW, Arechaga I, Risueño RM, Van Santen HM, Cabezas P, Risco C, et al. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J Exp Med* 2005; 202:493-503.
19. Schamel WW, Risueno RM, Minguet S, Ortiz AR, Alarcon B. A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends Immunol* 2006;27:176-182.
20. Vogt AB, Spindeldreher S, Kropshofer H. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev* 2002; 189:136-151.
21. van de Griend RJ, Borst J, Tax WJ, and Bolhuis RL. Functional reactivity of WT31 monoclonal antibody with T cell receptor-gamma expressing CD3+4-8- T cells. *J Immunol* 1988; 140:1107-1110.
22. Thibault G, Bardos P. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 1995; 154:3814-3820.
23. Timon M, Arnaiz-Villena A, Rodriguez-Gallego C, Perez-Aciego P, Pacheco A., Regueiro JR. Selective disbalances of peripheral blood T lymphocyte subsets in human CD3 gamma deficiency. *Eur J Immunol* 1993; 23:1440-1444.
24. Zapata DA, Pacheco-Castro A, Torres PS, Ramiro AR, San Jose E, Alarcon B, et al. Conformational and biochemical differences in the TCR/CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J Biol Chem* 1999; 274:35119-35128.
25. Zapata DA, Schamel WWA, Torres PS, Alarcón B, Rossi NE, Navarro M, et al. Biochemical differences in the alpha beta T cell receptor. CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:24485-24492.
26. Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 1996; 384:577-581.
27. Rudd PM, Wormald MR, Stanfield RL, Huang M, Mattsson N, Speir JA, et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* 1999; 293:351-66.
28. Chatenoud L. CD3-specific antibodies restore self-tolerance: mechanisms and clinical applications. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:632-637.
29. Criado G, Feito MJ, Ojeda G, Sanchez A, Janeway CA Jr, Portoles P, et al. Variability of invariant mouse CD3epsilon chains detected by anti-CD3 antibodies. *Eur J Immunol* 2000; 30:1469-1479.
30. Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 2005; 6:80-89.
31. Gil D, Schrum AG, Alarcon B, Palmer E. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *J Exp Med* 2005; 201:517-522.
32. Szymczak AL, Workman CJ, Gil D, Dilioglou S, Vignali KM, Palmer E, et al. The CD3epsilon proline-rich sequence, and its interaction with Nck, is not required for T cell development and function. *J Immunol* 2005; 175:270-275.
33. La Gruta NL, Liu H, Dilioglou S, Rhodes M, Wiest DL, Vignali DA. Architectural changes in the TCR:CD3 complex induced by MHC:peptide ligation. *J Immunol* 2004; 172:3662-3669.
34. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 1995; 375:148-151.
35. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 2006; 24:133-139.
36. Wang B, Wang N, Salio M, Sharpe A, Allen D, She J, et al. Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alpha beta and gamma delta T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188: 1375-80.
37. Pan Q, Brodeur JF, Drbal K, Dave VP. Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: Human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice. *Mol Immunol* 2006; 43:1741-1750.
38. de Saint-Basile G, Geissmann F, Rieux-Laucat F, Hivroz C, Soudais C, Jabado N, et al. Severe combined immunodeficiency caused by CD3 subunit delta, epsilon and zeta deficiency. *ESID meeting, Versailles* 2004; 1.
39. Brooimans RA, Rijkers GT, Wulffraat NM, Zegers BJM. Severe combined immunodeficiency in a patient with defective expression of CD3. *Exp Clin Immunobiol* 2000; 203:463.
40. Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:675-687.
41. Roufosse F, Cogan E, Goldman M. Recent advances in pathogenesis and management of hypereosinophilic syndromes. *Allergy* 2004; 59:673-689.

# CD3D

## 1. Authors and affiliations

María J. Recio, Jesús Reiné, Edgar Fernández-Malavé and José R. Regueiro\*  
Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040, Madrid, Spain  
Tel: +34913941630/40; Fax: +34913941641; email: [regueiro@med.ucm.es](mailto:regueiro@med.ucm.es)

\*Corresponding author

## 2. Target Validation

### a) Validation Table (Table 1)

Attached as separate file

### c) Disease models (Table 2)

Target protein	Species	Model	Disease	Ref	Source
CD3D	Mouse	CD3D null mice	SCID	1	Kappes DJ
CD3D	Mouse	CD3D null cell lines	SCID	2	Schmitt-Verhulst

#### *CD3D null mice*

CD3D knockout mice exhibit impaired  $\alpha\beta$ , but not  $\gamma\delta$ , T cell development due to a blockade at the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double positive; DP) intrathymic stage (1, Figure 1), as determined by flow cytometric and biochemical (immunoprecipitation and 2-D SDS-PAGE) analyses of thymocytes. In contrast, CD3D-deficient humans show a severe defect in both an  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell development due to an earlier block at the CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (double negative; DN) stage (3,4). Defective T cell development in CD3D-deficient patients was demonstrated by immunohistochemical analysis of tissue sections from lymphoid organs and by flow cytometry.

#### *CD3D null cell lines*

Humans and mice lacking CD3D have no mature  $\alpha\beta$  T cells. Therefore, the role of CD3D in mature T cells cannot be addressed in these models. Mouse cytolytic T cell lines lacking CD3D and CD3G were transfected with CD3G to generate CD3D null T cell lines (2). These cultured cell lines could be useful as models of mature human T cells lacking CD3D (1) (see Section 3b).

## 3. Drugs and Biotherapeutics

### a) Current status (November, 2007)

#### *Biotherapeutics*

To date, Core Peptide (CP) is the only biotherapeutic targeting CD3D. CP is a synthetic hydrophobic peptide (GLRILLKV) designed from the mouse and human TCRA transmembrane sequence interacting with CD3D (5). CP is being developed by Nicholas Manolios' group presently at the Department of Rheumatology, Westmead Hospital, Westmead, Australia. CP has been found to inhibit T cell function *in vitro*, as assessed by antigen-induced IL-2 production using the mouse 2B4 T cell hybridoma; and CD3-zeta (CD3Z; CD3 $\zeta$ ) chain phosphorylation in the 2B4 line using immunoprecipitation, SDS-PAGE and western blot (5,6). Moreover, CP ameliorate clinical signs of inflammation in T cell mediated disease models (see section 2b) including allergic contact dermatitis (7), adjuvant-induced arthritis, experimental allergic

neuritis and, cyclophosphamide-induced diabetes (5). Phase I studies in humans suggest that CP is an effective topical treatment in many T cell mediated dermatological disorders, including atopic dermatitis, lichen planus, psoriasis and allergic contact dermatitis (7,8,9). Dendritic cells transduced by retroviral agents containing a CP variant construct are able to secrete the peptide in a localized and antigen-specific manner capable of inhibiting murine experimental autoimmune encephalomyelitis (10; section 2b).

It has been postulated that CP disrupts the transmembrane charges between the TCRA and the CD3DE and CD3-zeta (CD3Z; CD3 $\zeta$ ) chains (11). This would result in a non-functioning TCR consisting of only the TCRA and TCR-beta (TCRB; TCR $\beta$ ) heterodimer and the CD3GE subunits. However, a recent study including co-transfection experiments of TCRA and CD3D in COS-7 cells and analysis of TCR and CD3 chains interaction in the 2B4 T cell line, indicates that CP has no effect on TCRA/CD3D dimerisation or TCR multisubunit assembly and cell surface expression (12). CP immunosuppressive activity, examined in 2B4 T cell activation *in vitro* assays and by using a rat model of adjuvant-induced arthritis, was enhanced by lipidation and glycosylation (11), or by replacing its positive residues (arginine and lysine) by their D-enantiomers (13).

Patent for CP: US Patent 6,057,294. Inventors: Nicholas Manolios (Kensington AU); Assignee: Northern Sydney Area Health Service of Pacific Highway (St. Leonards, AU). The invention provides peptides which affect T cells, presumably by action on the T cell antigen receptor. It further relates to the therapy of various inflammatory and autoimmune disease states involving the use of these peptides.

To our knowledge, there is no information available as to CP entering or not Phase II trials. We believe that further developments regarding clinical applications of CP has been hampered by two facts: 1) the molecular mechanisms responsible for the inhibition of TCR and T cell function by CP remains unknown; 2) CP also affects non-T cell (i.e., B and NK cells) function (14), as shown using NK cytotoxicity and B cell proliferation assays with human peripheral blood lymphocytes and mouse splenic B cells, respectively.

#### *CD3D-specific ligands (Table 4)*

The only antibody known to recognize the ectodomain of (human) CD3D, termed anti-CD3 $\delta$ C $\beta$  Ab, was developed by Bent Rubin's group at Unité de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UPR-2163, Hôpital Purpan, Toulouse, France. This antibody binds CD3D in isolation but does not bind TCR/CD3 complexes on the cell surface (15), suggesting that CD3D is buried in the TCR/CD3 complex by protein contacts and by glycosylation. This topology of CD3D within the TCR complex is bound to hamper the generation and use of anti-CD3D monoclonal antibodies as therapeutic tools.

A monoclonal antibody (OKT3) that binds surface CD3-epsilon (CD3E; CD3 $\epsilon$ ) only when associated to CD3D (or CD3G, 16) is strongly immunosuppressive and has been used extensively in humans for the treatment of allograft rejection. Therefore it targets CD3DE dimers. It was the first monoclonal antibody licensed for use in humans (17).

Table 3. CD3D ligands

Reagent	Type <sup>1</sup>	Species	Specificity <sup>2</sup>	Source	Com. available
anti-CD3 $\delta$ C $\beta$	Mab	Mouse	heCD3D	B. Rubin	No
N-15	AS	Goat	hCD3D	Santa Cruz Biotechnology	Yes
F-12	AS	Goat	m,r,hCD3D		
C-20	AS	Goat	hCD3D		
FL-171	AS	Rabbit	m,r,hCD3D		

M-20	AS	Goat	m,r,hCD3D		
V-19	AS	Goat	hCD3D		
J31	AS	Rabbit	m,hCD3D	Alarcón B	No
R9	AS	Rabbit	m,hCD3D	Samelson LE	No
APA-1/2	Mab	Mouse	miCD3D, hiCD3D	Alarcón B, Terhorst C	No

<sup>1</sup> AS=antiserum, Mab=monoclonal antibody

<sup>2</sup> h=human, e= ectodomain, i=intracellular, m=mouse, r= rat

## **b) Next frontiers**

### *Extracellular and transmembrane interactions*

Questions yet to be answered are related to the exact nature of the region in the ectodomain and transmembrane portion of CD3D responsible for interfacing with TCRA, CD3Z, and CD8 (or CD4), and the identity of the critical amino acid residues in the CD3D sequence governing these interactions (18). These issues could be approached by site-directed mutagenesis of CD3D domains for expression in standard non-lymphoid lines and CD3D-deficient cell lines and mice. The latter would allow further understanding of the role of specific domains of CD3D in T cell development and function. Further, generation of CD3D constructs encompassing regions other than the globular ectodomain could be valuable tools for solving the structure of such domains. The ultimate goal would be the development of small molecular mimics or inhibitors, i.e. peptides, peptidomimetic, and nonpeptidic organic compounds (19) of these surface functional sites as potential therapeutic agents.

### *Intracellular interactions*

The phosphorylation of the conserved immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), which is located in the cytoplasmic tails of each CD3 subunit, generates binding sites for intracellular signalling molecules (20). The challenge now is the identification of both ITAM-dependent (21) and ITAM-independent (22) CD3D-specific intracellular ligands, and the characterization of their binding sites as potential candidates for therapeutic modulation of TCR-mediated T cell activation. CD3D mutants with intact or disrupted ITAM could be analyzed in the Ras-recruitment system, a version of the yeast two-hybrid technology (23), for identification of potential intracellular ligands of CD3D. How the ERAD/UPS machinery (section 4a) specifically acts on CD3D (and TCRA), and its impact on TCR assembly and export from the endoplasmic reticulum (ER) remain to be elucidated. In these particular, site-directed CD3D mutants can be also of value for defining how CD3D interacts, for instance, with the deubiquitylating enzyme ataxin-3 (AT-3), and with other enzymes responsible of ubiquitylating, deubiquitylating, or extracting ERAD substrates from the ER. Interference of the ERAD/UPS pathway specifically targeting CD3D could be envisaged as a strategy for fine-tuning TCR assembly and export, and ultimately TCR surface expression.

Finally, as both CD3D-deficient mice and humans lack  $\alpha\beta$  T cells, analysis of the role of CD3D in the mature  $\alpha\beta$  T cell compartment awaits the development of conditional (tissue-specific) CD3D knockout mice, or the analysis of T cells in which CD3D is knocked-down by RNA interference.

## **4. Function and localization**

Flow cytometric analyses show that CD3D is a type I transmembrane glycosylated polypeptide expressed selectively on the surface of T lymphocytes (24). It is part of the



pre-TCR complex and therefore plays a role in early T cell development (Section 4a). But it is also part of the mature TCR complex, and thus is involved in late T cell development and mature T cell function (3,4,25). CD3D forms a dimer with CD3E and participates in pre-TCR,  $\alpha\beta$  TCR, and  $\gamma\delta$  TCR assembly through its interaction with pre-T-alpha (pTA; pT $\alpha$ ), TCRA, and TCR-delta (TCRD; TCR $\delta$ ), respectively (26,27). CD3D critically participates in  $\alpha\beta$  TCR-mediated signalling through its coupling to the LAT-Ras-signalling pathway (25). In studies involving mouse thymocytes and T cell hybridomas expressing the T1 TCR (specific for a peptide from the Plasmodium berghei circumsporozoite) and FRET and biochemical analyses, CD3D was shown to physically associate with and functionally link the  $\alpha\beta$  TCR to CD8 (28,29). This coupling is critical for efficient TCR triggering and activation of CD8<sup>+</sup> T cells.

#### **a) In homeostasis**

##### *Pre-TCR complex*

The pre-T cell receptor (pre-TCR) complex consists of a pTA/TCRB heterodimer assembled with CD3D, CD3E, CD3G, and CD3Z subunits. Impairment of  $\beta$  selection (DN-to-DP transition) seen in pT $\alpha$  knockout (KO) or TCR $\beta$  KO mice suggests that pre-TCR plays an essential role in the DN-to-DP transition by transducing signals for survival, proliferation and differentiation of DN into DP cells (30). As we have described in section 2c (CD3D null mice) DN-to-DP transition is impaired in CD3D-deficient humans but not in their mouse counterparts, indicating an essential role for CD3D in pre-TCR expression and/or function in humans but not in mice (Figure 1) (3,4,1). Thus, mouse and human CD3D appear to exert distinct functions during T cell development, despite a highly conserved structure and sequence in both species. This interspecies difference could be the consequence of CD3D playing different roles in pre-TCR or TCR complex assembly and/or signalling in humans *versus* mice.

##### *TCR complex*

*Intracellular receptor assembly, transport to the cell surface and membrane expression.* Pulse-chase immunoprecipitation experiments performed using the human leukemic T cell lines Jurkat, REX, HPB-ALL, PEER, and MOLT4 show that one of the initial steps in the assembly of the  $\alpha\beta$  TCR complex (Figure 2) is the association of CD3DE and CD3GE dimers with the TCRA and TCRB subunits respectively, in the endoplasmic reticulum (ER; 31,32,33). CD3D may therefore primarily come into play after completion of TCRA chain synthesis. ER-associated degradation (ERAD) is a protein quality control mechanism that eliminates unwanted proteins from the ER through the Ubiquitin-dependent Proteasome System (UPS). CD3D and TCRA are typical ERAD substrates. Their flow through the ERAD pathway is critically modulated by the binding of ataxin-3 (AT3), a deubiquitylating enzyme, to VCP/p97 (Valosin-containing Protein), a key protein responsible for extracting ERAD substrates from the ER, as demonstrated by co-transfection of HEK293T cells with expression vectors for CD3D and a mutated AT3 with decreased binding to VCP/p97 (34). Surprisingly, in a different study involving RNA interference in HeLa cells, VCP/p97 appeared to be dispensable for the UPS-dependent degradation of CD3D (35). Moreover, using RNA interference in 293 cells, the VCP/p97-binding protein gp78 was shown to negatively regulate the intracellular levels of CD3D (36).

Upon recruitment of a CD3Z homodimer, the complete  $\alpha\beta$  TCR complex exits the endoplasmic reticulum and is transported to the cell membrane (31,37). In a similar fashion, CD3GE dimers associate preferentially with TCR-gamma (TCRG; TCR $\gamma$ ) chains, and CD3DE dimers with TCRD chains to generate the  $\gamma\delta$  TCR (37).

*Positive selection of  $\alpha\beta$  T cells.* The  $\alpha\beta$  TCR complex is required for the DP-to-SP (single positive) transition during late thymocyte development (Figure 1) (38). CD3D plays a critical role in the assembly and function of the early macromolecular signalling complex ("signalosome") initiated upon  $\alpha\beta$  TCR engagement in DP thymocytes subjected to positive selection (20). Particularly, the extracellular and/or transmembrane domains of CD3D are essential for coupling the TCR to ERK but not JNK and p38 activation, as demonstrated by biochemical analyses of MAPK phosphorylation in thymocytes from CD3D knockout mice; and also in a mouse strain harbouring a mutation in a motif within the TCRA chain connecting peptide domain, termed  $\alpha$ -CPM (25,39). This function of CD3D is likely mediated by its interaction with the  $\alpha$ -CPM (39), and results in the effective assembly of a proximal signalosome featuring effective phosphorylation of the CD3Z subunit in lipid raft-associated TCR complexes, followed by proper activation of the LAT/Ras/signalling pathway (25). Further, CD3D appears to modulate the kinetics of signalling activation induced by high- or low-affinity TCR ligands (39). Thus, CD3D endows the TCR complex with "emerging" properties essential for thymocyte positive selection (40).

*Signal transduction in mature  $\alpha\beta$  T cells.* There is abundant evidence for a link between CD3 components and downstream events in TCR-mediated signalling. All CD3 subunits carry the conserved ITAM motif in the intracytoplasmic region. CD3D, CD3G and CD3E have one ITAM, whereas CD3Z has three (41,42). The ITAM motif is composed of two tyrosine residues separated by 6 to 8 residues and it is involved in TCR-mediated signalling (43). Upon ligand binding by the TCR, the ITAMs get tyrosine phosphorylated by the src-related kinase Lck (44). Phosphorylated ITAMs can recruit the zeta-associated kinase (ZAP-70), which initiates key downstream events including the recruitment of SLP-76 and LAT adaptor molecules (20,45,46). Many of these fundamental insights into TCR signalling came from biochemical analysis (Immunoprecipitation, SDS-PAGE and Western-Blot) carried out with transformed T-cell line of human (for example, HPB-ALL, HuT-78) and mouse (EL4, LBRM-33) origins. Perhaps the best know of these model systems is the Jurkat leukaemic T-cell line. Coupling of CD3D to the TCRA  $\alpha$ -CPM motif also plays a role in the control of antigen responsiveness (47). Defective antigen response was showed by IL-2 and IL-3 assays carried out with T hybridomas expressing chimeric TCRs (generated by replacing domains of the  $\alpha$  and  $\beta$  chain constant regions with homologous domains from TCR $\delta$  and  $\gamma$  chains, respectively) incubated with LG2-presenting cells and various concentration of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) superantigen.

## ***b) In disease***

### ***Dermatitis***

Several inflammatory skin diseases such as psoriasis, atopic dermatitis and mycosis fungoides are believed to be  $\alpha\beta$  T-cell dependent (48). Irrespectively of the antigens or allergens involved in each disorder, the mechanism is believed to be similar: T lymphocytes recognize skin antigens or allergens by means of their surface  $\alpha\beta$  TCR, and are thus activated to proliferate and orchestrate a cellular and humoral autoimmune response which causes skin inflammation. The normal function of CD3D in mature T cells is 1) to participate in TCR assembly to ensure a proper expression of the TCR/CD3 complex on the cell surface, and 2) to translate extracellular antigen recognition by the variable TCR chains into intracellular activation signals which drive clonal T cell expansion, differentiation and effector functions. These roles take place both in normal T-cell responses against pathogens and in pathogenic T-cell responses against the antigens or allergens involved in skin disorders.

An eight amino acid peptide mimicking the TCR-alpha (TCRA; TCR $\alpha$ ) chain that likely disrupts the transmembrane interaction of CD3D with TCRA by binding to CD3D has been shown to inhibit T cell functions *in vitro* and *in vivo* (5, Section 3). The immunomodulatory effects of the peptide GLRILLKV (termed Core Peptide or CP) *in vivo* were examined in an experimental allergic contact dermatitis model in mice (7). Balb/c mice were sensitized with an experimental contact allergen (trinitrochlorobenzene), challenged 5 days later and the T-cell mediated response was measured as ear swelling in 24 h. Epicutaneous CP at day 5, but not a control peptide, reduced ear swelling. CP did not have any effect at day 6, suggesting that it did not affect already swelled tissues (7). The injection of naked DNA coding for CP also reduced ear swelling in this model. A control plasmid coding for an irrelevant peptide did not reduce ear swelling. CP DNA did not reduce non specific irritation, such as that induced by acetone. Dendritic cells transduced with adenoviral vectors carrying a secreted form of CP were shown to be immunosuppressive for T cells *in vivo* in a similar model of contact dermatitis (10).

Five normal human subjects were sensitized with a nontoxic contact allergen (diphenylcyclopropenone), challenged one week later and the T-cell mediated response (contact eczema) was measured as local inflammation and documented histologically after 24 h (7). Epicutaneous CP or betamethasone just before the challenge, but not a control peptide, blocked the inflammation and T cell infiltration. Nine patients with skin diseases characterized by a strong T cell infiltrate and responsive to corticosteroids (psoriasis, atopic eczema and lichen planus) were treated with a cream containing CP, betamethasone or control peptide for 3 days (7). In contrast to controls, all patients except one reported a marked improvement or cure of the disease following application of CP or betamethasone. The function of CD3D in skin diseases is thus the same as in normal responses against pathogens, but the T-cell clones involved are different. As activation of T cells requires signal transduction, disruption of the CD3D/TCRA transmembrane interaction using peptides such as CP likely ablates signal transduction in pathogenic T-cell clones and thus ameliorates skin disease progression (Section 2b). The immunosuppressive effect will of course take place both in normal and pathogenic T-cell responses. This explains why immunosuppression can cause increased susceptibility to infection (49).

### *Arthritis*

The immunomodulatory effects of CP *in vivo* were also examined in an adjuvant-induced arthritis model in Wistar rats (5). In this model, peptides in squalane oil were coadministered with heat-killed *Mycobacterium tuberculosis*. The arthritic condition was assessed by measuring maximum tail and rear paw thickness as well as number of arthritic joints involved. A single subcutaneous dose of CP or cyclosporin, but not control peptides, had a protective effect against the induction of arthritis in this animal model. Several types of arthritis including psoriatic and rheumatoid arthritis are autoimmune diseases (50). Arthritogenic T-cell clones recognize synovial self antigens by means of the TCR/CD3 complex, and orchestrate a cellular and humoral autoimmune response which causes joint inflammation. The function of CD3D in arthritis is the same as in normal responses against pathogens, but the T-cell clones involved are different. Disruption of the CD3D/TCRA transmembrane interaction using peptides such as CP likely ablates signal transduction in arthritogenic T-cell clones and thus ameliorates disease progression (Section 2b).

### *Neuritis*

T cells are believed to contribute to disease pathogenesis in several demyelinating neuropathies (51). One such neuropathy is experimental allergic neuritis, a model for

inflammatory demyelinating neuropathies such as Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (51). In this model Lewis rats were immunized in each hind foot with bovine peripheral nerve myelin emulsified in complete Freund's adjuvant. CP as a single subcutaneous bolus delayed induction and clinical severity of disease (5). Pathogenic T-cell clones recognize myelin self antigens by means of the TCR/CD3 complex, and orchestrate a cellular and humoral autoimmune response which causes inflammation and tissue injury in the peripheral nervous system. The function of CD3D in neuritis is the same as in normal responses against pathogens, but the T-cell clones involved are different. Disruption of the CD3D/TCRA transmembrane interaction using peptides such as CP likely ablates signal transduction in pathogenic T-cell clones and thus ameliorates disease progression (Section 2b).

#### *Diabetes*

T cells are believed to contribute to disease pathogenesis in autoimmune diabetes (52). Female non-obese diabetic mice were treated intraperitoneally with cyclophosphamide, and blood glucose was measured weekly (5). The development of diabetes mellitus in this animal model is thought to be secondary to a T-cell dependent autoimmune lesion directed against the pancreatic islet beta cells (52). Subcutaneous CP, but not ovalbumin, protected treated mice against diabetes (5). Pathogenic T-cell clones recognize beta cell autoantigens by means of the TCR/CD3 complex, and orchestrate a cellular and humoral autoimmune response which causes the destruction of insulin-producing pancreatic beta cells. The function of CD3D in diabetes is the same as in normal responses against pathogens, but the T-cell clones involved are different. Disruption of the CD3D/TCRA transmembrane interaction using peptides such as CP likely ablates signal transduction in diabetogenic T-cell clones and thus ameliorates disease progression (Section 2b).

#### *Multiple sclerosis*

T cells are believed to contribute to disease pathogenesis in multiple sclerosis (53). T cells are believed to be responsible for disease pathogenesis in experimental autoimmune encephalitis (EAE), a model for multiple sclerosis (a chronic, inflammatory, demyelinating disease that affects the central nervous system, (53). EAE was induced by injection of spinal cord homogenate emulsified in complete Freund's adjuvant into transgenic TG4 mice (10). These mice carry transgenic T cells expressing a TCR that is specific for myelin basic protein. EAE symptoms ranging from mild (partial paralysis of the tail) to severe (complete paralysis of all feet and death) are recorded every two days. Most mice die within three weeks. Dendritic cells transduced with adenoviral vectors carrying a secreted form of CP (ELRILLKLV) were shown to reduce EAE symptoms and improve survival both in a preventive and in a therapeutic setting (10). Pathogenic T-cell clones recognize myelin self antigens by means of the TCR/CD3 complex, and orchestrate a cellular and humoral autoimmune response which causes the destruction of the myelin sheath in the central nervous system. The function of CD3D in multiple sclerosis is the same as in normal responses against pathogens, but the T-cell clones involved are different. Disruption of the CD3D/TCRA transmembrane interaction using peptides such as CP likely ablates signal transduction in encephalitogenic T-cell clones and thus ameliorates disease progression (Section 2b).

#### *Severe Combined Immunodeficiency (SCID)*

The normal function of CD3D in early T-cell development is 1) to participate in pre-TCR assembly to ensure a proper expression of the pre-TCR/CD3 complex on the cell surface, and 2) to signal for survival, proliferation and differentiation of DN into DP cells. In CD3D deficiency these functions are defective and, as a consequence, T-cell development is abrogated. In 6 patients from four unrelated families, CD3D deficiency has been found as the cause of an autosomal recessive T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> phenotype of SCID (3,4,54). In all cases, the selective absence of mature T cells led to early onset (first

months of life) severe infections. The phenotypic consequences of CD3D deficiency are clear-cut. Results obtained from flow cytometric analyses of peripheral-blood lymphocytes show that no mature  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  CD3<sup>+</sup> T cells are detected in the periphery, including both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. In contrast, the number of B cells and NK lymphocytes is normal (3,4,54). Sequencing of the CD3 $\delta$  PCR product from these patients revealed three different CD3D gene mutations (Figure 3). In all cases, the mutations are expected to truncate the CD3D protein in its extracellular domain, thus impairing membrane association and expression of TCR ensembles (3,4,54). Thymic biopsies from affected infants and fetuses have been analyzed for messenger RNA and proteins associated with T cell development (3,4). In some tested patients, CD4 and CD8  $\alpha\beta$  mRNA and proteins as well as TCRA and B mRNA and proteins were low, indicating a block at the transition from DN to DP thymocytes (3). Therefore, the CD3D subunit is essential for human T cell development (Figure 1).

#### *T-cell mediated diseases*

CD3D, together with other genes involved in inflammation, was upregulated in salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients (55), and it was downregulated in psoriasis patients who responded to alefacept treatment (56), as shown by gene expression profiling techniques. Changes in CD3D transcripts, however, may simply reflect changes in relative T lymphocyte numbers, as CD3D is strictly T lymphocyte-specific (Section 4). In mice, the lack of CD3D (and hence of  $\alpha\beta$  T cells) protects from virus-induced immunopathology (57)

### **5. Characteristic structural features**

CD3D is non-covalently associated to the rest of the TCR/CD3 complex. The crystal structure of human CD3DE bound by single chain Mab UCHT-1 is available at 1.9 Å resolution (58, PDB accession number 1XIW).

#### **a) Domains and motifs**

The primary structure of human CD3D includes a 21 amino acid long signal peptide, a 79 amino acid long extracellular segment with two N-glycosylation sites (4), one transmembrane domain of 27 amino acids, and a cytoplasmic portion of 44 amino acid residues (Figure 3) containing the tyrosine-based activation motif (ITAM). CD3D is associated with CD3E through the extracellular domain, to TCRA (and possibly pTA) through the extracellular and transmembrane domains, and to AP-2 through the intracellular domain (18,59). A functional link with CD8 has also been reported (29) using TCR photoaffinity labelling, FRET and coimmunoprecipitation experiments on mouse thymocytes and T cell hybridomas expressing the T1 TCR (specific for a peptide from the *Plasmodium berghei* circumsporozoite). A single, membrane-distal motif in the cytoplasmic tail of CD3D has been reported to mediate most TCR/CD3 internalization (60) as determined by TCR internalization assay in 293T cells transfected with plasmids carrying different CD3 chains mutations (YxxØ motif) and by the yeast two-hybrid experiments.

The solution structures of the human CD3DE (in combination with a UCHT1 single-chain antibody fragment) and CD3D (sheep)/CD3E (mouse) ectodomains have been determined by NMR spectroscopy (58, PDB accession number 1XIW, 61, PDB accession number 1XMW). Whereas the CD3E subunit conformation is virtually identical to that in CD3GE, the CD3D ectodomain adopts a C1-set Ig fold, with a narrower GFC front face  $\beta$ -sheet that is more parallel to the ABED back face than those  $\beta$ -sheets in CD3E and CD3G (61). These structures, together with those of  $\alpha\beta$  TCR and CD3GE, allow the building of a model for the topology of assembled TCR/CD3 ectodomains in which

CD3DE is docked to the TCRA chain by using residues from the constant domain as docking targets (Figure 2).

### **b) Targeted features (Figure 2)**

Aspects of CD3D structure relevant to druggability of the protein (see also Section 3).

#### *Ectodomain*

The extracellular domain encompasses regions, yet to be defined in detail, interacting with TCRA (18,61), and those, also still undefined, for recruitment of CD4/CD8 co-receptors (29). Epitopes for monoclonal antibodies with potential therapeutic value could also map in the globular domain of the extracellular region.

#### *Transmembrane region*

This region contains the conserved negatively charged amino acid, which controls the electrostatic interfaces with TCRA and CD3Z (62). These electrostatic “fasteners” are critical for TCR assembly and stability, thus amenable to manipulation.

#### *Cytoplasmic tail*

The intracellular domain contains ITAM-dependent (43) and, putatively, ITAM-independent binding sites for intracellular signalling molecules, as well as specific structural domains for interaction with the ERAD/UPS machinery (34,35,36). All of these are potential candidates for pharmaceutical intervention.

## **6. Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Ministerio de Educación (BFU2005-01738/BMC), Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/570/2004) and Fundación Mutua Madrileña. J.R. was supported by CAM (Comunidad Autónoma de Madrid). We are grateful to V. Pérez Flores for help with graphics.

## **7. References**

1. Dave, V. P., Z. Cao, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, H. A. de la, S. Tonegawa, and D. J. Kappes. 1997. CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage. *EMBO J.* 16:1360-1370.
2. Luton, F., M. Buferne, V. Legendre, E. Chauvet, C. Boyer, and A. M. Schmitt-Verhulst. 1997. Role of CD3gamma and CD3delta cytoplasmic domains in cytolytic T lymphocyte functions and TCR/CD3 down-modulation. *J.Immunol.* 158:4162-4170.
3. Dadi, H. K., A. J. Simon, and C. M. Roifman. 2003. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N.Engl.J.Med.* 349:1821-1828.
4. de Saint, B. G., F. Geissmann, E. Flori, B. Uring-Lambert, C. Soudais, M. Cavazzana-Calvo, A. Durandy, N. Jabado, A. Fischer, and F. Le Deist. 2004. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J.Clin.Invest* 114:1512-1517.
5. Manolios, N., S. Collier, J. Taylor, J. Pollard, L. C. Harrison, and V. Bender. 1997. T-cell antigen receptor transmembrane peptides modulate T-cell function and T cell-mediated disease. *Nat.Med.* 3:84-88.

6. Wang, X. M., J. T. Djordjevic, N. Kurosaka, S. Schibeci, L. Lee, P. Williamson, and N. Manolios. 2002. T-cell antigen receptor peptides inhibit signal transduction within the membrane bilayer. *Clin.Immunol.* 105:199-207.
7. Gollner, G.P., G. Muller, R. Alt, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. Therapeutic application of T cell receptor mimic peptides or cDNA in the treatment of T-cell mediated skin diseases. *Gene Ther.* 7:1000-1004
8. Enk, A. H. and J. Knop. 2000. T cell receptor mimic peptides and their potential application in T-cell-mediated disease. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 123:275-281.
9. Manolios, N., N. T. Huynh, and S. Collier. 2002. Peptides in the treatment of inflammatory skin disease. *Australas.J.Dermatol.* 43:226-227.
10. Mahnke, K., Y. Qian, J. Knop, and A. H. Enk. 2003. Dendritic cells, engineered to secrete a T-cell receptor mimic peptide, induce antigen-specific immunosuppression in vivo. *Nat.Biotechnol.* 21:903-908.
11. Amon, M. A., M. Ali, V. Bender, Y. N. Chan, I. Toth, and N. Manolios. 2006. Lipidation and glycosylation of a T cell antigen receptor (TCR) transmembrane hydrophobic peptide dramatically enhances in vitro and in vivo function. *Biochim.Biophys.Acta* 1763:879-888.
12. Kurosaka, N., A. Bolte, M. Ali, and N. Manolios. 2007. T-cell antigen receptor assembly and cell surface expression is not affected by treatment with T-cell antigen receptor-alpha chain transmembrane Peptide. *Protein Pept.Lett.* 14:299-303.
13. Quintana, F. J., D. Gerber, I. Bloch, I. R. Cohen, and Y. Shai. 2007. A structurally altered D,L-amino acid TCRalpha transmembrane peptide interacts with the TCRalpha and inhibits T-cell activation in vitro and in an animal model. *Biochemistry* 46:2317-2325.
14. Huynh, N. T., R. A. Ffrench, R. A. Boadle, and N. Manolios. 2003. Transmembrane T-cell receptor peptides inhibit B- and natural killer-cell function. *Immunology* 108:458-464.
15. Rubin, B., L. Alibaud, A. Huchenq-Champagne, J. Arnaud, M. L. Toribio, and J. Constans. 2002. Some hints concerning the shape of T-cell receptor structures. *Scand.J.Immunol.* 55:111-118.
16. Salmeron, A., F. Sanchez-Madrid, M. A. Ursa, M. Fresno, and B. Alarcon. 1991. A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 147:3047-3052.
17. 1985. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. *N.Engl.J.Med.* 313:337-342.

18. Xu, C., M. E. Call, and K. W. Wucherpfennig. 2006. A membrane-proximal tetracysteine motif contributes to assembly of CD3deltaepsilon and CD3gammaepsilon dimers with the T cell receptor. *J.Biol.Chem.* 281:36977-36984.
19. Huang, Z., S. Li, and R. Korngold. 1997. Immunoglobulin superfamily proteins: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* 43:367-382.
20. Werlen, G. and E. Palmer. 2002. The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:299-305.
21. Osman, N., H. Turner, S. Lucas, K. Reif, and D. A. Cantrell. 1996. The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur.J.Immunol.* 26:1063-1068.
22. Gil, D., W. W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901-912.
23. Kohler, F. and K. M. Muller. 2003. Adaptation of the Ras-recruitment system to the analysis of interactions between membrane-associated proteins. *Nucleic Acids Res.* 31:e28.
24. von Boehmer, H. 1988. The developmental biology of T lymphocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 6:309-326.
25. Delgado, P., E. Fernandez, V. Dave, D. Kappes, and B. Alarcon. 2000. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 406:426-430.
26. Call, M. E. and K. W. Wucherpfennig. 2004. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol.Immunol.* 40:1295-1305.
27. Alibaud, L., J. Arnaud, R. Llobera, and B. Rubin. 2001. On the role of CD3delta chains in TCRgamma delta/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand.J.Immunol.* 54:155-162.
28. Doucey, M. A., L. Goffin, D. Naeher, O. Michielin, P. Baumgartner, P. Guillaume, E. Palmer, and I. F. Luescher. 2003. CD3 delta establishes a functional link between the T cell receptor and CD8. *J.Biol.Chem.* 278:3257-3264.
29. Naeher, D., I. F. Luescher, and E. Palmer. 2002. A role for the alpha-chain connecting peptide motif in mediating TCR-CD8 cooperation. *J.Immunol.* 169:2964-2970.
30. Yamasaki, S. and T. Saito. 2007. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol.* 28:39-43.



31. Kears, K. P., J. L. Roberts, and A. Singer. 1995. TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes. *Immunity*. 2:391-399.
32. Arnaud, J., C. Chenu, A. Huchenq, C. Gouaillard, J. Kuhlmann, and B. Rubin. 1996. Defective interactions between TCR chains and CD3 heterodimers prevent membrane expression of TCR-alpha beta in human T cells. *J.Immunol.* 156:2155-2162.
33. Arnaud, J., A. Huchenq, M. C. Vernhes, S. Caspar-Bauguil, F. Lenfant, J. Sancho, C. Terhorst, and B. Rubin. 1997. The interchain disulfide bond between TCR alpha beta heterodimers on human T cells is not required for TCR-CD3 membrane expression and signal transduction. *Int.Immunol.* 9:615-626.
34. Zhong, X. and R. N. Pittman. 2006. Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum.Mol.Genet.* 15:2409-2420.
35. Wojcik, C., M. Rowicka, A. Kudlicki, D. Nowis, E. McConnell, M. Kujawa, and G. N. DeMartino. 2006. Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells. *Mol.Biol.Cell* 17:4606-4618.
36. Zhong, X., Y. Shen, P. Ballar, A. Apostolou, R. Agami, and S. Fang. 2004. AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J.Biol.Chem.* 279:45676-45684.
37. Klausner, R. D., J. Lippincott-Schwartz, and J. S. Bonifacino. 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annu.Rev.Cell Biol.* 6:403-431.
38. Werlen, G., B. Hausmann, D. Naeher, and E. Palmer. 2003. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299:1859-1863.
39. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422-426.
40. Backstrom, B. T., U. Muller, B. Hausmann, and E. Palmer. 1998. Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science* 281:835-838.
41. Haks, M. C., T. A. Cordaro, J. H. van den Brakel, J. B. Haanen, E. F. de Vries, J. Borst, P. Krimpenfort, and A. M. Kruisbeek. 2001. A redundant role of the CD3 gamma-immunoreceptor tyrosine-based activation motif in mature T cell function. *J.Immunol.* 166:2576-2588.
42. Osman, N., H. Turner, S. Lucas, K. Reif, and D. A. Cantrell. 1996. The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur.J.Immunol.* 26:1063-1068.

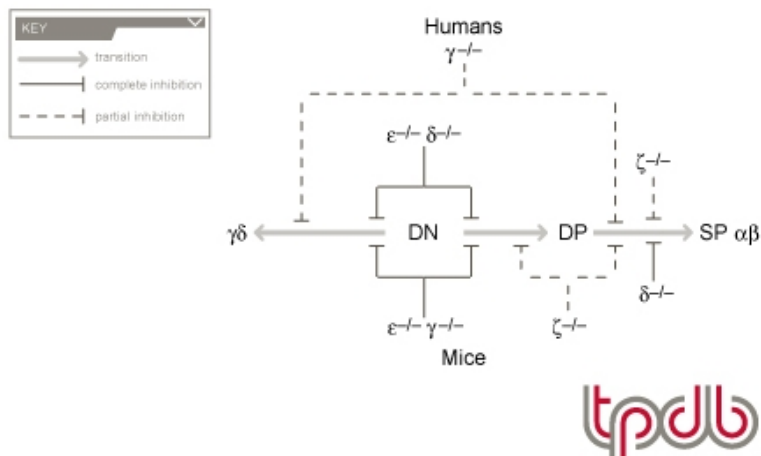
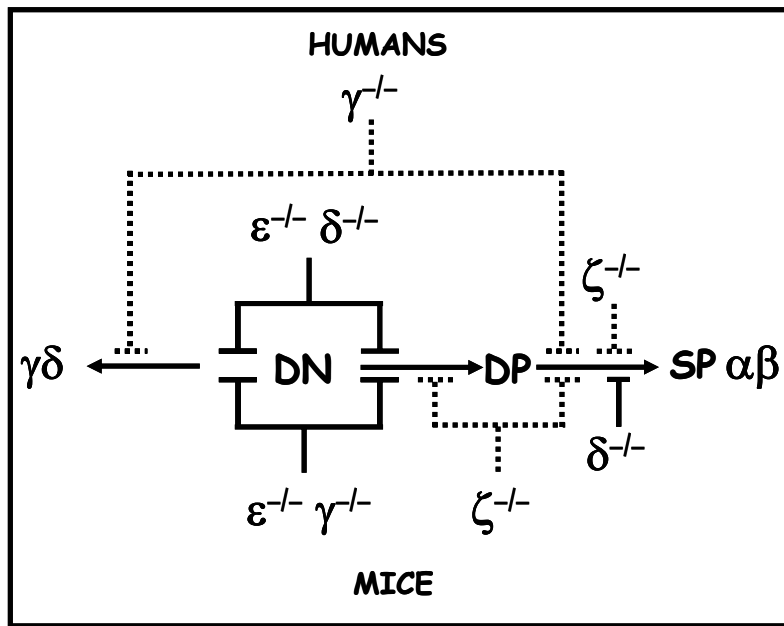
43. Isakov, N. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades. *J.Leukoc.Biol.* 61:6-16.
44. Straus, D. B. and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585-593.
45. Abraham, R. T. and A. Weiss. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat.Rev.Immunol.* 4:301-308.
46. Samelson, L. E. 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu.Rev.Immunol.* 20:371-394.
47. Backstrom, B. T., E. Milia, A. Peter, B. Jaureguiberry, C. T. Baldari, and E. Palmer. 1996. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity.* 5:437-447.
48. Chong, B. F. and H. K. Wong. 2007. Immunobiologics in the treatment of psoriasis. *Clin.Immunol.* 123:129-138.
49. Elenkov, I. J. 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1024:138-146.
50. Steiner, G. 2007. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* 32:23-36.
51. Dalakas, M. C. 1995. Basic aspects of neuroimmunology as they relate to immunotherapeutic targets: present and future prospects. *Ann.Neurol.* 37 Suppl 1:S2-13.
52. Chatenoud, L. and J. A. Bluestone. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol.* 7:622-632.
53. Stinissen, P., J. Raus, and J. Zhang. 1997. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev.Immunol.* 17:33-75.
54. Takada, H., A. Nomura, C. M. Roifman, and T. Hara. 2005. Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur.J.Pediatr.* 164:311-314.
55. Hjelmervik, T. O., K. Petersen, I. Jonassen, R. Jonsson, and A. I. Bolstad. 2005. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* 52:1534-1544.
56. Haider, A. S., M. A. Lowes, H. Gardner, R. Bandaru, K. Darabi, F. Chamian, T. Kikuchi, P. Gilleaudeau, M. S. Whalen, I. Cardinale, I. Novitskaya, and J. G. Krueger. 2007. Novel insight into the agonistic mechanism of alefacept in vivo:

differentially expressed genes may serve as biomarkers of response in psoriasis patients. *J.Immunol.* 178:7442-7449.

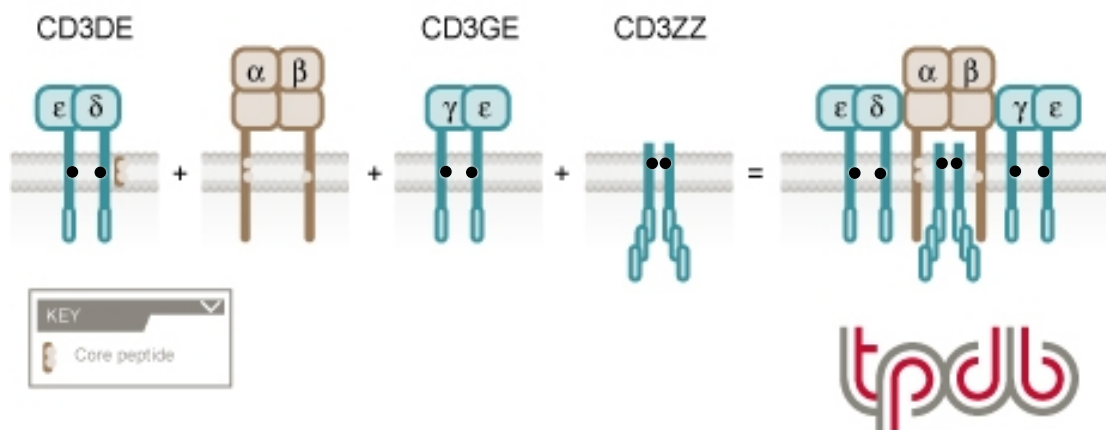
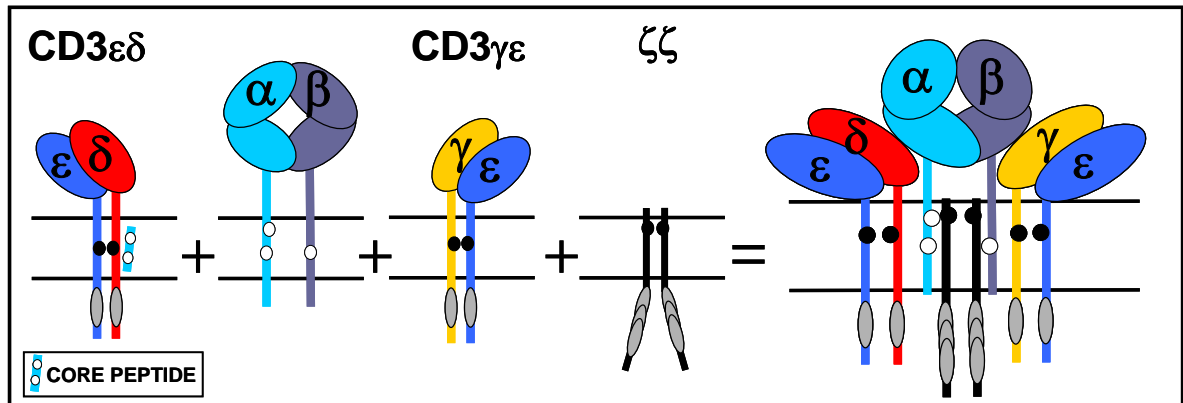
57. Kappes, D. J., D. M. Lawrence, M. M. Vaughn, V. P. Dave, A. R. Belman, and G. F. Rall. 2000. Protection of CD3 delta knockout mice from lymphocytic choriomeningitis virus-induced immunopathology: implications for viral neuroinvasion. *Virology* 269:248-256.
58. Arnett, K. L., S. C. Harrison, and D. C. Wiley. 2004. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:16268-16273.
59. Call, M. E. and K. W. Wucherpfennig. 2005. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu.Rev.Immunol.* 23:101-125.
60. Szymczak, A. L. and D. A. Vignali. 2005. Plasticity and rigidity in adaptor protein-2-mediated internalization of the TCR:CD3 complex. *J.Immunol.* 174:4153-4160.
61. Sun, Z. Y., S. T. Kim, I. C. Kim, A. Fahmy, E. L. Reinherz, and G. Wagner. 2004. Solution structure of the CD3epsilon/delta ectodomain and comparison with CD3epsilon/gamma as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:16867-16872.
62. Call, M. E., J. Pyrdol, M. Wiedmann, and K. W. Wucherpfennig. 2002. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111:967-979.
63. Recio, M. J., M. A. Moreno-Pelayo, S. S. Kilic, A. C. Guardo, O. Sanal, L. M. Allende, V. Perez-Flores, A. Mencia, S. Modamio-Hoybjor, E. Seoane, and J. R. Regueiro. 2007. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J.Immunol.* 178:2556-2564.
64. Roberts, J. L., J. P. Lauritsen, M. Cooney, R. E. Parrott, E. O. Sajaroff, C. M. Win, M. D. Keller, J. H. Carpenter, J. Carabana, M. S. Krangel, M. Sarzotti, X. P. Zhong, D. L. Wiest, and R. H. Buckley. 2007. T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* 109:3198-3206.
65. Malissen, M., A. Gillet, B. Rocha, J. Trucy, E. Vivier, C. Boyer, F. Kontgen, N. Brun, G. Mazza, E. Spanopoulou, and . 1993. T cell development in mice lacking the CD3-zeta/eta gene. *EMBO J.* 12:4347-4355.
66. Love, P. E., E. W. Shores, M. D. Johnson, M. L. Tremblay, E. J. Lee, A. Grinberg, S. P. Huang, A. Singer, and H. Westphal. 1993. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 261:918-921.

67. Malissen, B., L. Ardouin, S. Y. Lin, A. Gillet, and M. Malissen. 1999. Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development. *Adv.Immunol.* 72:103-148.

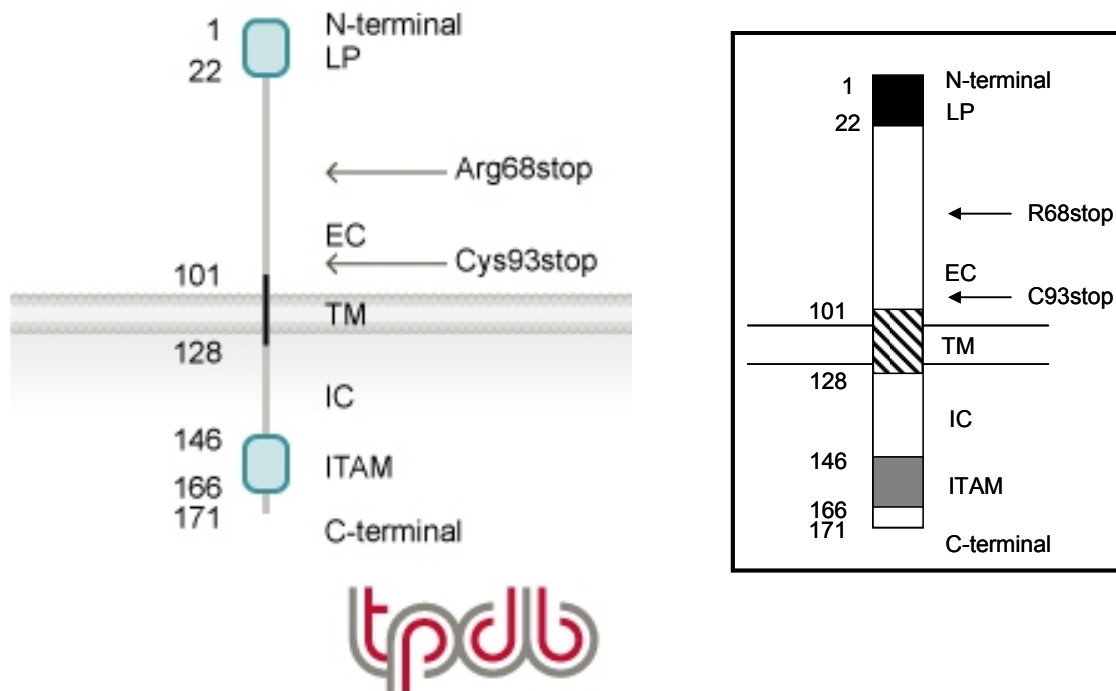
## 8. Figures and Figure Legends



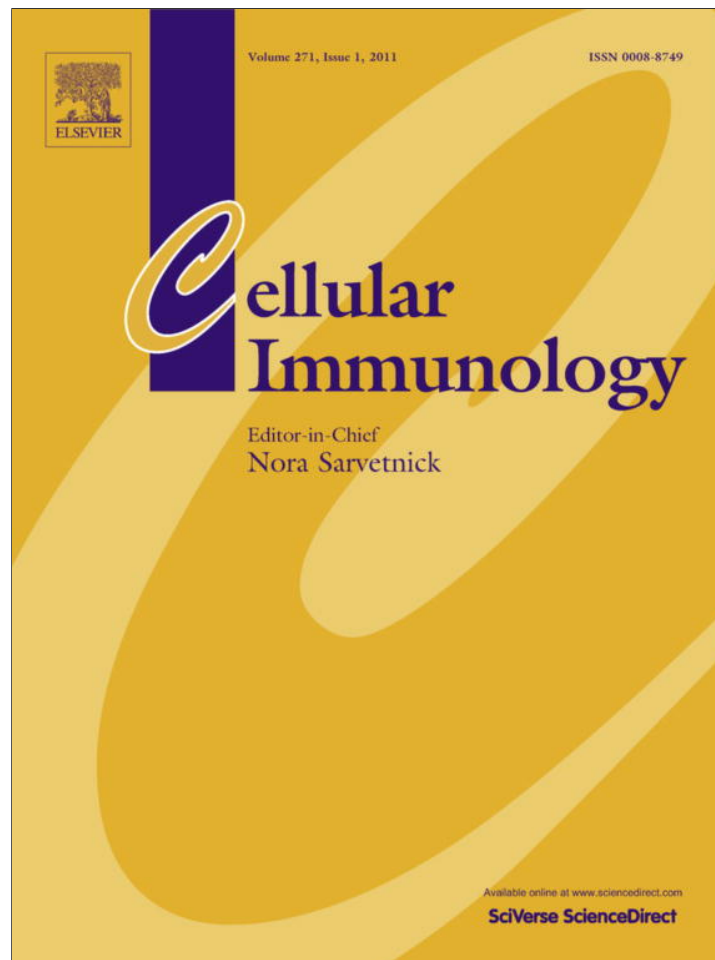
**Figure 1.** Partial (---|) and complete (—|) developmental blocks in T cell differentiation caused by CD3 subunit deficiency in humans (63,64) and mice (65,66,67,). T cell development is simplified in two steps: 1) pre-TCR-mediated double-negative (DN)  $CD4^{-}CD8^{-}$  to double-positive (DP,  $CD4^{+}CD8^{+}$ ) transition; 2) positive/negative selection signalled by the  $\alpha\beta$  TCR and generation of single-positive (SP)  $CD4^{+}$  and  $CD8^{+}$   $\alpha\beta$  T cells.  $\gamma\delta$  T cells develop from DN thymocytes.



**Figure 2.** Proposed association of the  $\alpha\beta$  T-cell receptor heterodimer with the CD3 dimers CD3DE, CD3GE and CD3ZZ [62]. Right: docking model depicting potential ectodomain interactions of CD3 and  $\alpha\beta$  TCR; white and black circles represent conserved basic and acidic amino acids in the transmembrane domain, respectively. Ovals represent ITAMs in CD3 cytoplasmic tails. Targeted features include the binding site for the core peptide (CP) [3].



**Figure 3.** CD3D protein structure, including the extracellular (EC), transmembrane (TM) and intracellular (IC) regions, as well as the leader peptide (LP) and ITAM. *CD3D* gene mutations are also indicated. A homozygous mutation has also been observed in the splicing acceptor site of intron 2 (IVS2-2A→G), leading to a splicing abnormality of the *CD3D* gene. Skipping of exon 3 results in the lack of a whole transmembrane domain and a part of the extracellular and intracellular domain (shown in black).



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ycimm](http://www.elsevier.com/locate/ycimm)


# CD3 $\gamma$ -independent pathways in TCR-mediated signaling in mature T and iNKT lymphocytes

Jesús Reiné<sup>a,b</sup>, Elena M. Busto<sup>a,b</sup>, Miguel Muñoz-Ruiz<sup>a,b</sup>, Nineth E. Rossi<sup>c</sup>, José L. Rodríguez-Fernández<sup>d</sup>, Eduardo Martínez-Naves<sup>a</sup>, José R. Regueiro<sup>a,b,1</sup>, María J. Recio<sup>a,b,1,\*</sup>

<sup>a</sup>Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Facultad de Medicina Extensión Táchira, Universidad de Los Andes, Venezuela

<sup>d</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 February 2011

Accepted 8 June 2011

Available online 22 June 2011

### Keywords:

T cells  
Cell signaling  
T cell receptors

## ABSTRACT

Antigen recognition by T-lymphocytes through the T-cell antigen receptor, TCR–CD3, is a central event in the initiation of an immune response. CD3 proteins may have redundant as well as specific contributions to the intracellular propagation of TCR-mediated signals. However, to date, the relative role that each CD3 chain plays in signaling is controversial. In order to examine the roles of CD3 $\gamma$  chain in TCR signaling, we analyzed proximal and distal signaling events in human CD3 $\gamma^{-/-}$  primary and *Herpesvirus saimiri* (HVS)-transformed T cells. Following TCR–CD3 engagement, certain early TCR signaling pathways (ZAP-70, ERK, p38 and mTORC2 phosphorylation, and actin polymerization) were comparable with control HVS-transformed T cells. However, other signaling pathways were affected, such TCR $\zeta$  phosphorylation, indicating that the CD3 $\gamma$  chain contributes to improve TCR signaling efficiency and survival. On the other hand, CD3 $\gamma^{-/-}$  primary invariant NKT cells (iNKT cells) showed a normal expansion in response to  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) and TCRV $\beta$ 11<sup>bright</sup> iNKT cells were preferentially selected in this *in vitro* culture system, perhaps as a consequence of selective events in the thymus. Our results collectively indicate that a TCR lacking CD3 $\gamma$  can propagate a number of signals through the remaining invariant chains, likely the homologous CD3 $\delta$  chain, which replaces it at the mutant TCR.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Antigens initiate an immune response in T cells via the T cell receptor (TCR). The TCR itself is widely regarded as one of the most complex receptors in nature, as it is comprised of at least six different subunits, two variable polypeptide chains which bind antigens, and several invariant chains (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  and TCR $\zeta$ ), which are organized in dimers and contain 10 different immunoreceptor tyrosine activation motifs (ITAMs) required for T-cell differentiation in the thymus and for antigen recognition in peripheral lymphoid organs [1]. The importance of each invariant chain and subsequently each ITAM has been the focus of intense research. However, the relative contribution and intracellular connections of each invariant chain during TCR–CD3-mediated signaling are still controversial [2,3].

To dissect explicitly the requirement for the TCR invariant chains in T-cell development and signal transmission, TCR $\zeta^{-/-}$  or

CD3-deficient cell lines and/or mice are commonly used. An analysis of gene-targeted mice revealed that CD3 $\epsilon^{-/-}$ , TCR $\zeta^{-/-}$  and CD3 $\gamma^{-/-}$  mice have a complete block in thymopoiesis, whereas CD3 $\delta^{-/-}$  mice show a partial block with normal numbers of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells [4–7] (Fig. S1).

Based on the data published by Oers et al. [8], two non-exclusive models have been proposed to explain the recent developments regarding TCR signaling. In the first model, termed the ITAM multiplicity model, there is functional redundancy of TCR $\zeta$  and CD3 ITAM. Equivalent functions would be mediated by four of the ten ITAMs, regardless of whether they are contributed by TCR $\zeta$  or CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$ . In the differential signaling model, distinct functions for TCR $\zeta$  and CD3 signaling modules were proposed. The CD3 module would be primarily responsible for proliferation and effector functions, whereas the TCR $\zeta$  module might be responsible for maintaining cell survival and function in pathogen clearance.

Using the immunomodulatory peptide termed core peptide, which is believed to inhibit TCR activation by disrupting TCR–CD3 interactions, a tri-modular signaling system for T cell activation has been proposed. By contrast to the previous bi-modular signaling model ( $\zeta_2$  and CD3 $\epsilon\gamma/\epsilon\delta$ ), each of the three dimers (CD3 $\gamma\epsilon$ ,

\* Corresponding author at: Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Fax: +34 913941641.

E-mail address: [majoreho@med.ucm.es](mailto:majoreho@med.ucm.es) (M.J. Recio).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

$\delta\epsilon$ , and  $\zeta_2$ ) would act as distinct signaling modules, performing both specific and redundant functions [9].

Previous studies performed in human  $CD3\gamma^{-/-}$  HVS-transformed T cells suggest a specialized contribution by  $CD3\gamma$  to certain T cell responses, such as adhesion or IL-2 induction, and a redundant role for other responses, such as proliferation, cytotoxicity or TNF- $\alpha$  induction [10,11]. In the present work we have explored the participation of  $CD3\gamma$  in other relevant TCR- $CD3$ -induced T lymphocytes responses such as activation of the MAP-Kinase pathways, polymerization and reorganization of F-actin and iNKT expansion in response to  $\alpha$ -GalCer.

Our results collectively indicate that a TCR lacking  $CD3\gamma$  can propagate a number of signals through the remaining invariant chains, likely the homologous  $CD3\delta$  chain, which replaces it at the mutant TCR with  $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta\zeta$  stoichiometry [12]. Therefore the total number of ITAMs is more than seven as recently reported to be required for normal immune function in mice [13]. However these structural and functional features seem unique to the  $CD3\gamma$  chain, as all other reported complete TCR or  $CD3$  chain deficiencies are uniformly lethal in humans (Table S1).

## 2. Material and methods

### 2.1. T cell lines, primary T cells and cultures

HVS-transformed T cell lines were derived from PBL of healthy  $CD3\gamma^{-/-}$  individuals carrying different mutations in  $CD3G$  (IV.4 and III.2) [14] or normal,  $CD3\gamma^{+/+}$  donors, as previously described [10]. IV.4 is homozygous (c.205A > T), born to consanguineous Turkish parents. III.2 is compound heterozygous (c.1A > G; c.IVS2-1G > C) belonging to a nonconsanguineous Spanish family. Clinical data of these patients have been included in Table S2 (Supplementary material). HVS-transformed T cells were always grown in parallel in 1:1 RPMI:Panserin medium from Gibco Invitrogen and PAN-Biotech GmbH, respectively. In all cases media were supplemented with 100 IU/ml human rIL-2 (Hoffman-La Roche), 10% FCS (Flow Laboratories) and 1% glutamine. Media were replaced every 3–4 days. Except where indicated, all experiments were performed on resting HVS-transformed cells that were generated by starving cells overnight in RPMI/Panserin with 2% FCS but not IL-2 the day before medium replacement was due. Before use, cells were washed twice in PBS and resuspended in RPMI/Panserin 10% FCS without IL-2. The human T cell line Jurkat was provided by Dr. B. Rubin (Centre National de la Recherche Scientifique, Centre Hospitalier Universitaire, Purpan, Toulouse, France). iNKT cells obtained from PBL of  $CD3\gamma^{-/-}$  (III.2) and  $CD3\gamma^{+/+}$  donors were activated with 50 IU/ml rhIL-2 and 100 ng/ml  $\alpha$ -GalCer (Kirin). After two weeks cells were stained with anti-TCR $\alpha$ 24 and anti-TCR $\beta$ 11 (Coulter Immunotech) and double positive cells were identified as iNKT cells by flow cytometry.

Both primary [15] and transformed [10,16]  $CD3\gamma^{-/-}$  T lymphocytes have been shown to lack  $CD3\gamma$  completely. However, their surface TCR- $CD3$  is expressed at significant levels on the cell surface (Fig. S2), with a  $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta\zeta$  instead of the normal  $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$  stoichiometry [12]. Signaling through the mutant  $CD3\gamma^{-/-}$  TCR- $CD3$  thus allows to define  $CD3\gamma$ -independent pathways in T cells.

### 2.2. Phosphorylation assays

Phosphorylated proteins in response to anti- $CD3$  treatment were detected by flow cytometry or Western immunoblotting of cell lysates with anti-phospho-specific mAbs: 4G10 from Upstate Biotechnology; phospho-JNK (clone G-7) from Santa Cruz Biotechnology; phospho-ERK (Thr202/Tyr204), phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-ZAP70 (Tyr319/SykTyr352) and phospho-

mTORC2 (Ser2481) from Cell Signaling. Briefly,  $4 \times 10^6$  resting cells/ml were stimulated with a  $CD3$ -specific mAb (10  $\mu$ g/ml UCHT-1) at 4 °C for 30 min and cross-linked with 20  $\mu$ g/ml polyclonal goat anti-mouse Ig (H + L) (Cappel, Organon Teknika Corp West Chester) at 37 °C for several time periods (1–30 min). Lysates were then centrifuged at 12,000g for 30 min and supernatants were subjected to SDS-PAGE 10% and transferred onto PVDF membrane using a semi-dry transfer system for 45 min at 15 V (Bio-Rad). After blocking and subsequent incubation with appropriate dilutions of specific mAbs, membranes were rinsed and incubated with peroxidase-labeled goat anti-mouse Ig (Amersham International, UK) or with peroxidase-labeled goat anti-rabbit Ig (Sigma Chemical Co., USA) and detected by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham). Intracellular staining was performed as previously described [10]. Samples were analyzed in FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest and FlowJo software (Tree Star).

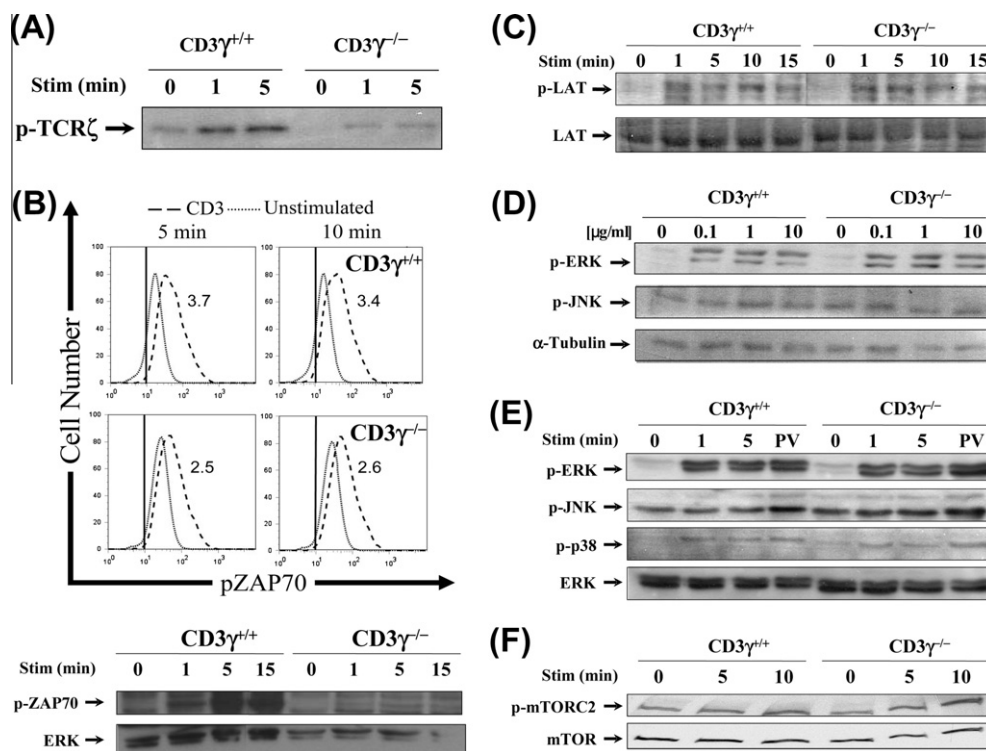
### 2.3. Staining of filamentous actin

Cortical actin reorganization was analyzed as described [17] on HVS-transformed T cell lines derived from III.2 PBL. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells/well were stimulated with precoated OKT3 in 8-well chamber slides (Nunc). The reactions were stopped by fixing the cells in 2% paraformaldehyde (Sigma Chemical, St. Louis, MO) for 30 min at room temperature. After washing with PBS, slides were incubated with tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-labeled phalloidin (Molecular Probes, 1:50 dilution in PBS/0.05% Saponin) for 40 min at room temperature. Cells were subsequently washed in PBS, the chambers were removed and the slides were air-dried. Coverslips were mounted using Vectashield mounting media with DAPI (H-1200, Vector Laboratories). Microphotography was carried out using a Zeiss Axiolmager.A1 microscope (Carl Zeiss). For the analysis of  $CD3$ -induced actin polymerization by flow cytometry, cells were stimulated in OKT3-coated 24-well plates, fixed and stained as above. Cells were washed and resuspended in PBS, and analyzed after appropriate gating in a FACSCalibur. If saturating quantities of fluorescent phalloidin are used, fluorescence is a quantitative measure of the amount of filamentous actin in cells.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Proximal signaling events in $CD3\gamma^{-/-}$ HVS-transformed T cells

Previous results have shown that  $CD3\gamma^{-/-}$  T cells can undergo tyrosine phosphorylation of the appropriate target substrates after TCR- $CD3$  triggering, although with slightly unsustained kinetics for some proteins (40, 42, 70 and 81 kDa) [11]. Thus, to evaluate  $CD3\gamma$ -dependent regulation of specific biochemical signaling events following anti- $CD3$  stimulation,  $CD3\gamma^{-/-}$  HVS-transformed T cells were stimulated with anti- $CD3$  and tyrosine phosphorylation of TCR $\zeta$ , ZAP-70, LAT, MAPKs (ERK 1/2, JNK and p-38) and mTORC2 was assessed using phosphospecific mAbs for the different target proteins. JNK was not informative in transformed T cells due its high basal activity (Fig. 1D). As shown in Fig. 1A, the phosphorylation level for TCR $\zeta$  in  $CD3\gamma^{-/-}$  T cells was considerably lower than in control T cells. It could be argued that lower TCR- $CD3$  expression by  $CD3\gamma^{-/-}$  T cells (Fig. S2) might explain the defective TCR $\zeta$  phosphorylation. However, it did not affect the phosphorylation of other downstream molecules such as ZAP-70, LAT, ERK, p38 and mTORC2 (Fig. 1B–F and Fig. S3). These results suggest that impaired TCR $\zeta$  phosphorylation was  $CD3\gamma$ -dependent in  $CD3\gamma^{-/-}$  T cells. One possible explanation for this finding is the reported impaired association of TCR $\zeta$  to the mutant  $CD3\gamma^{-/-}$  TCR complex



**Fig. 1.** Proximal signaling events in CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> HVS-transformed T cells. (A) Phospho-TCR $\zeta$  was detected by anti-phospho-tyrosine antibody immunoprecipitation and anti-TCR $\zeta$  immunoblotting after anti-CD3 stimulation for the times indicated. (B) Phospho-ZAP70 was detected by flow cytometry (upper panel) and Western-blot (lower panel). Upper panel. Representative histograms of ZAP-70 phosphorylation. Human CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> and control T cells were unstimulated (dotted line) or stimulated with anti-CD3 (UCHT-1, dashed line) for the times indicated. The numbers in each panel indicate the mean fluorescence intensity ratio between stimulated and unstimulated control and CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> T cells. The vertical solid line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. (C)–(F) Human CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> and control T cells were stimulated *in vitro* with soluble anti-CD3 (UCHT-1) (10  $\mu$ g/ml, panel B, C, E and F; 0.1–10  $\mu$ g/ml, panel D) or with pervanadate (PV). Cell lysates were analyzed by Western blotting for the indicated proteins at various time points following activation. Phospho-LAT was detected by anti-phospho-tyrosine antibody immunoprecipitation and anti-LAT immunoblotting (panel C). LAT,  $\alpha$ -Tubulin, ERK and mTOR proteins were used as loading control (panel C, D, E and F, respectively). The results are representative of three independent experiments.

[16]. To exclude the possibility that anti-CD3 antibody concentrations used to stimulate T cells could provide a very strong stimulus which could mask subtle differences in the activation profiles, we performed dose–response experiments. The results showed that ERK1/2 activation was normal even at very low anti-CD3 concentrations (0.1  $\mu$ g/ml, Fig. 1D).

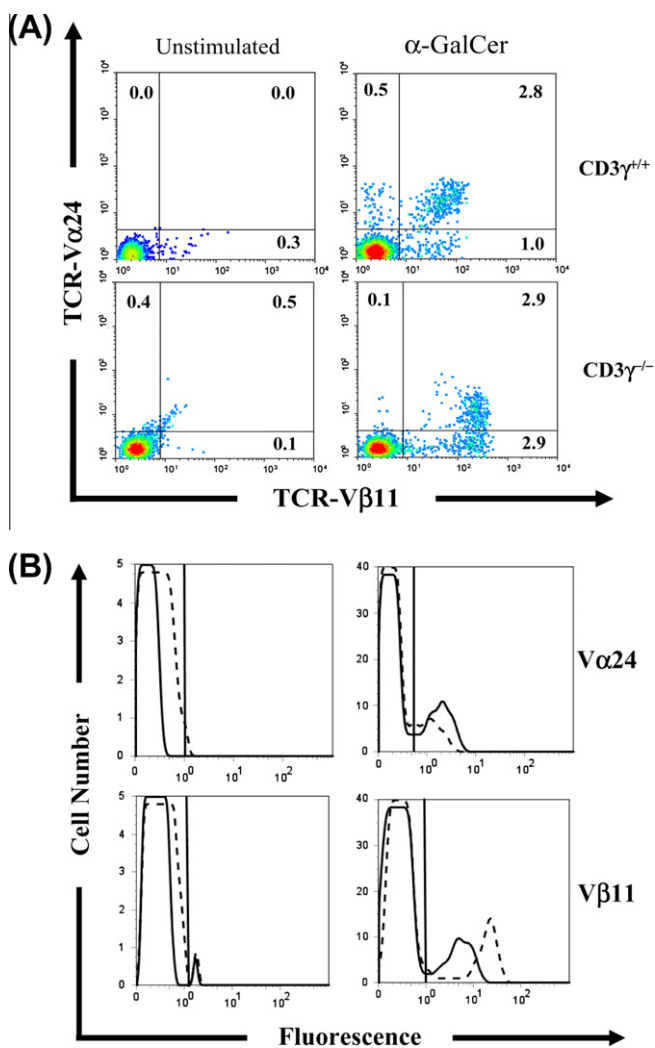
Our findings suggest that CD3 $\gamma$  has a redundant role for several signaling pathways. This may explain normal TCR–CD3-induced mature T cell responses previously reported in CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> T cells, including calcium flux, cell cytotoxicity, CD69 or CD154 up-regulation, proliferation (Fig. S4) and synthesis of certain cytokines (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) [10]. However, other signaling pathways are affected, such as TCR $\zeta$  phosphorylation in this work and certain mature T cell responses reported previously (PMA-induced TCR–CD3 down-regulation and TCR–CD3-induced synthesis of IL-2) [10].

Although studies in primary cells would be required to confirm our findings, we believe that transformed T cells are useful as a model system of natural mutant T cells. We have shown that transformed T cells, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, preserve several phenotypic and functional features of the parental cell lines (CD3 expression, PMA downmodulation, IL-2 production) [18], which can be reversed by CD3 $\gamma$  retroviral transduction [19]. Furthermore, HVS-transformed T cells have been studied in other immunodeficiencies and showed a comparable immunophenotype/function to the parental cell lines [17,20–22]. In addition, in order to control for the inherent effects of the transformation we have always compared CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> versus control transformed T cells, thus any differences may be ascribed to the lack of CD3 $\gamma$ .

### 3.2. CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> iNKT cells show a normal response to $\alpha$ -GalCer and increased levels of TCRV $\beta$ 11

The signaling pathways required for iNKT development are only partially understood [23]. Previous results obtained in a set of TCR $\zeta$  transgenic mice with substitutions that eliminated the functions of the TCR $\zeta$  ITAMs indicate that a full complement of functional TCR $\zeta$  ITAMs is required for effective iNKT cell development [24]. In order to investigate the antigen-specific response of CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> iNKT cells *in vitro* we performed experiments aimed to expand iNKT cells with  $\alpha$ -GalCer. Our results showed an effective expansion of iNKT cells from CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> PBMC, equivalent to healthy controls (Fig. 2A). These findings indicate that CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> iNKT cells respond to *ex vivo* stimuli as efficiently as normal controls and are in agreement with the previous signaling results obtained in CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> T cells. Thus, TCRs devoid of CD3 $\gamma$  are functional in human iNKT cells. This is in contrast to proliferation assays with  $\alpha$ -GalCer performed in iNKT cells obtained from mice with defective TCR $\zeta$  ITAMs, which exhibited a limited proliferative response with a large percentage of cells blocked after only one or two rounds of cell division [24]. These differences could be due to differential signaling functions for each CD3 chains [3] or to their different roles in human versus mice.

Interestingly, we also observed that, after  $\alpha$ -GalCer stimulation, CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> iNKT cells strongly increased surface TCRV $\beta$ 11 levels (3-fold compared to control cells, Fig. 2B right). This was not the case for TCR V $\alpha$ 24, excluding kinetic differences in TCR regulation. As surface TCRV $\beta$ 11 levels were not increased at day 0 (Fig. 2B left), we believe that TCRV $\beta$ 11<sup>bright</sup> iNKT cells are preferentially selected

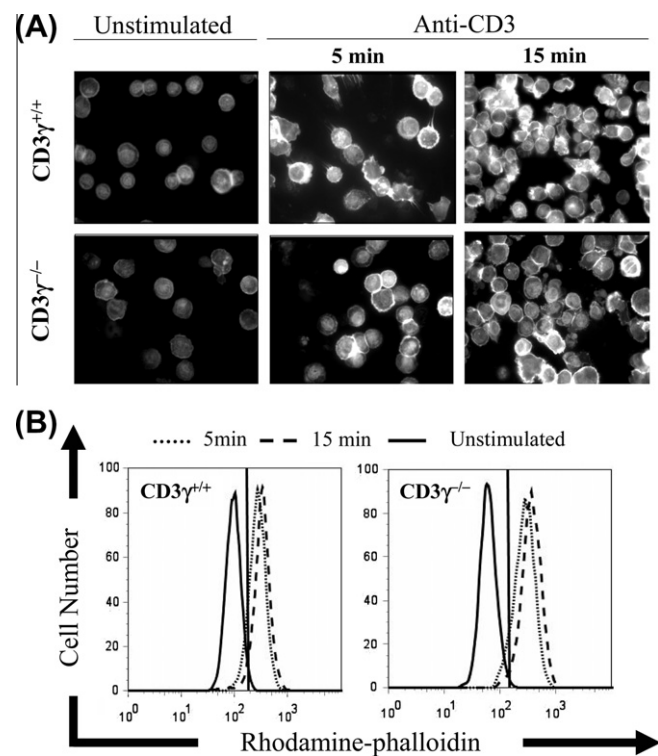


**Fig. 2.**  $CD3\gamma^{-/-}$  iNKT cells show a normal response to  $\alpha$ -GalCer and increased expression levels of V $\beta$ 11 (A) PBMCs from a  $CD3\gamma^{-/-}$  and a control donor ( $CD3\gamma^{+/+}$ ) were cultured for 11 days with 50 IU/ml rIL-2 and 100 ng/ml of  $\alpha$ -GalCer and stained as indicated. The number in each panel indicates the percentage of cells. (B) Comparative V $\alpha$ 24 and V $\beta$ 11 expression between human  $CD3\gamma^{-/-}$  (dashed line) and control iNKT cells (solid line) before (left) and after (right) stimulation with  $\alpha$ -GalCer. The vertical solid line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. The results are representative of three independent experiments.

by  $\alpha$ -GalCer in this *in vitro* culture system. As TCR is involved in CD1d recognition across species [25] and CD1d is first engaged in the thymus [26], it is tempting to speculate that in the absence of  $CD3\gamma$ , T cells with a peculiar V $\beta$ 11<sup>bright</sup> TCR $\alpha\beta$ , which is bound better by our mAb, are selected in the patients and expanded upon  $\alpha$ -GalCer stimulation *in vitro*.

### 3.3. Normal $CD3\gamma$ -dependent reorganization and polymerization of actin filaments in $CD3\gamma^{-/-}$ HVS-transformed T cells

Previous results suggested that  $CD3\gamma$  is required for the induction of cell adhesion and polarization through the TCR– $CD3$  [11]. In order to understand the role of  $CD3\gamma$  in this process,  $CD3\gamma^{-/-}$  HVS-transformed T-cells from III.2 were analyzed for the reorganization of actin filaments after stimulation with anti- $CD3$ . As shown in Fig. 3A, no differences were found as compared with control cells. The early phase of the response (5 min) showed a diffuse distribution of F-actin throughout the cytoplasm, with the typical actin



**Fig. 3.** (A) Normal  $CD3\gamma$ -dependent reorganization of actin filaments in  $CD3\gamma^{-/-}$  HVS-transformed T cells. Human  $CD3\gamma^{-/-}$  and control T cells were stimulated with immobilized anti- $CD3$  for the times indicated, fixed, permeabilized, stained with rhodamine-phalloidin, and analyzed by immunofluorescence. (B)  $CD3\gamma^{-/-}$  HVS-transformed T cells polymerize actin in response to stimulation with anti- $CD3$ . Human  $CD3\gamma^{-/-}$  and control T cells were stimulated with soluble anti- $CD3$  for the indicated times, fixed, permeabilized, stained with rhodamine-phalloidin, and analyzed by flow cytometry. Histograms show unstimulated (solid lines) versus stimulated cells for 5 min (dotted line) and 15 min (dashed line). The increase in the fluorescence intensity indicates a rapid passage from G-actin to F-actin in control and  $CD3\gamma^{-/-}$  T cells in response to anti- $CD3$ . The vertical solid line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. The results are representative of three independent experiments.

ring adjacent to the inner membrane. Remodelling of the actin cytoskeleton progressed with time, and spreading of cells was accompanied by the appearance of attachment pseudopods at 15 min after stimulation. These results are consistent with a normal polymerization of actin determined by phalloidin binding as detected by flow cytometry (Fig. 3B). This is in contrast with our previous results showing defective TCR– $CD3$ -induced specific cell adhesion and polarization in  $CD3\gamma^{-/-}$  transformed T cells from the same patient (III.2) [11]. However, F-actin polymerization was not analyzed in that study, a different anti- $CD3$  antibody was used (UCHT-1 instead of OKT3), and adhesion and polarization was assessed in ICAM-1-coated plastic plates. Thus our results indicate that TCR– $CD3$ -induced F-actin polymerization was likely not involved in the defective phenotype observed in that study, although other outside-in signaling pathways may be involved.

### 4. Conclusions

Our data suggest that  $CD3\gamma$  is dispensable for certain early TCR signaling pathways (ZAP-70, ERK, p38 and mTORC phosphorylation, and actin polymerization), and late iNKT cell functions ( $\alpha$ -GalCer response). These findings support a functional redundancy among  $CD3$  chains or modules, which could compensate for the lack of  $CD3\gamma$  for those biological responses. From a clinical point of view, signaling through the mutant TCR– $CD3$  complex is suffi-



cient for immune protection, as two CD3 $\gamma^{-/-}$  individuals are presently healthy and over their second and third decade [14]. However, other signaling pathways were affected, such as TCR $\zeta$  phosphorylation, indicating that the CD3 $\gamma$  chain contributes to improve TCR signaling efficiency and survival, as unfortunately confirmed by at least three CD3 $\gamma^{-/-}$  patients who died before their third birthday.

## Acknowledgments

This work was supported by Grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2002-1431 and BMC2002-3247); Ministerio de Educación (BFU2005-01738/BMC and SAF 2005-362); Fondo de Investigación Sanitaria (PI080921, PI080125 and PI060057); Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (GR/SAL/570/2004); RD 08/0075 (RIER) (RETICS Program/Instituto de Salud Carlos III); Dirección General de Universidades e Investigación and Fundación Mutua Madrileña to M.M.R., J.R.R. and M.J.R.; J.R., N.E.R. and E.M.B. were supported by the Comunidad Autónoma de Madrid (CAM), Universidad de los Andes and Ministerio de Educación y Ciencia (AP2006-01019), respectively. We are grateful to Edgar Fernández-Malavé and Beatriz Abós (Inmunología, Universidad Complutense de Madrid) for technical help and helpful advice.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.cellimm.2011.06.009](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2011.06.009).

## References

- [1] A. Weiss, D.R. Littman, Signal transduction by lymphocyte antigen receptors, *Cell* 76 (1994) 263–274.
- [2] D.J. Kappes, B. Alarcon, J.R. Regueiro, T lymphocyte receptor deficiencies, *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1995) 441–447.
- [3] B. Malissen, L. Ardouin, S.Y. Lin, A. Gillet, M. Malissen, Function of the CD3 subunits of the pre-TCR and TCR complexes during T cell development, *Adv. Immunol.* 72 (1999) 103–148.
- [4] M.C. Haks, P. Krimpenfort, J. Borst, A.M. Kruisbeek, The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages, *EMBO J.* 17 (1998) 1871–1882.
- [5] E.W. Shores, P.E. Love, TCR zeta chain in T cell development and selection, *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1997) 380–389.
- [6] C.L. Sommers, J.B. Dejarnette, K. Huang, J. Lee, D. El Khoury, E.W. Shores, P.E. Love, Function of CD3 epsilon-mediated signals in T cell development, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 913–919.
- [7] V.P. Dave, Z. Cao, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, H.A. de la, S. Tonegawa, D.J. Kappes, CD3 delta deficiency arrests development of the alpha beta but not the gamma delta T cell lineage, *EMBO J.* 16 (1997) 1360–1370.
- [8] L.A. Pitcher, N.S. van Oers, T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM?, *Trends Immunol.* 24 (2003) 554–560.
- [9] M.A. Amon, N. Manolios, Hypothesis: TCR signal transduction: a novel trimodular signaling system, *Mol. Immunol.* 45 (2008) 876–880.
- [10] A. Pacheco-Castro, D. Alvarez-Zapata, P. Serrano-Torres, J.R. Regueiro, Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T lymphocytes, *J. Immunol.* 161 (1998) 3152–3160.
- [11] P.S. Torres, D.A. Zapata, A. Pacheco-Castro, J.L. Rodríguez-Fernández, C. Cabanas, J.R. Regueiro, Contribution of CD3 gamma to TCR regulation and signaling in human mature T lymphocytes, *Int. Immunol.* 14 (2002) 1357–1367.
- [12] D.A. Zapata, W.W. Schamel, P.S. Torres, B. Alarcón, N.E. Rossi, M.N. Navarro, M.L. Toribio, J.R. Regueiro, Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor CD3 surface complex between CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  human mature T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24485–24492.
- [13] J. Holst, H. Wang, K.D. Eder, C.J. Workman, K.L. Boyd, Z. Baquet, H. Singh, K. Forbes, A. Chruscinski, R. Smeyne, N.S. van Oers, P.J. Utz, D.A. Vignali, Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 658–666.
- [14] M.J. Recio, M.A. Moreno-Pelayo, S.S. Kilic, A.C. Guardo, O. Sanal, L.M. Allende, V. Perez-Flores, A. Mencia, S. Modamio-Hoybjør, E. Seoane, J.R. Regueiro, Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies, *J. Immunol.* 178 (2007) 2556–2564.
- [15] P. Pérez-Aciego, B. Alarcón, A. Arnaiz-Villena, C. Terhorst, M. Timón, O.G. Segurado, J.R. Regueiro, Expression and function of a variant T cell receptor complex lacking CD3-gamma, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 319–326.
- [16] D.A. Zapata, A. Pacheco-Castro, P.S. Torres, A.R. Ramiro, E. San José, B. Alarcón, L. Alibaud, B. Rubin, M.L. Toribio, J.R. Regueiro, Conformational and biochemical differences in the TCR/CD3 complex of CD8 $^{+}$  versus CD4 $^{+}$  mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 35119–35128.
- [17] M.D. Gallego, M. Santamaría, J. Pena, I.J. Molina, Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott–Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation, *Blood* 90 (1997) 3089–3097.
- [18] C. Rodríguez-Gallego, A. Corell, A. Pacheco, M. Timón, J.R. Regueiro, L.M. Allende, A. Madroño, A. Arnaiz-Villena, Herpes virus saimiri transformation of T cells in CD3 gamma immunodeficiency: phenotypic and functional characterization, *J. Immunol. Methods* 198 (1996) 177–186.
- [19] A. Pacheco-Castro, J.M. Martín-Fernández, R. Millán, O. Sanal, L. Allende, J.R. Regueiro, Toward gene therapy for human CD3 deficiencies, *Hum. Gen. Ther.* 14 (2003) 1653–1661.
- [20] B.M. Bröker, M.S. Kraft, U. Klauenberg, F. Le Deist, J.P. de Villartay, B. Fleckenstein, B. Fleischer, E. Meinel, Activation induces apoptosis in Herpesvirus saimiri-transformed T cells independent of CD95 (Fas, APO-1), *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 2774–2780.
- [21] V. Stephan, V. Wahn, F. Le Deist, U. Dirksen, B. Broker, I. Müller-Fleckenstein, G. Horneff, H. Schroten, A. Fischer, G. de Saint Basile, Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 1563–1567.
- [22] D. Alvarez-Zapata, S. de Miguel Olalla, G. Fontán, A. Ferreira, M.C. García-Rodríguez, L. Madero, P. van den Elsen, J.R. Regueiro, Phenotypical and functional characterization of Herpesvirus saimiri-immortalized human major histocompatibility complex class II-deficient T lymphocytes, *Tissue Antigens* 51 (1998) 250–257.
- [23] D.I. Godfrey, D.G. Pellicci, O. Patel, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, J. Rossjohn, Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors, *Semin. Immunol.* 22 (2010) 61–67.
- [24] A.M. Becker, J.S. Blevins, F.L. Tomson, J.L. Eitson, J.J. Medeiros, F. Yarovsky, M.V. Norgard, N.S. van Oers, Invariant NKT cell development requires a full complement of functional CD3 zeta immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, *J. Immunol.* 184 (2010) 6822–6832.
- [25] N.A. Borg, K.S. Wun, L. Kjer-Nielsen, M.C. Wilce, D.G. Pellicci, R. Koh, G.S. Besra, M. Bharadwaj, D.I. Godfrey, J. McCluskey, J. Rossjohn, CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor, *Nature* 448 (2007) 44–49.
- [26] A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton, The biology of NKT cells, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 297–336.

**Table S1.- TCR complex deficiencies. Clinical and immunological data**

Deficiency	CD3δ																	
Family	1				2	3	4?				5	6	7			8	9	
Nationality	Mennonites (Canada, USA, Germany)										France			Japan			Ecuador	
Patient/sex	1F	2M	3M	4F	5M	6F	7M	8F	9M	10F	11F	12F	13M	14F	15M	16M	17M	18M
Consanguineous	Yes													No	Yes		No	
Mutation (leaky) <sup>7</sup>	Protein truncation													Skip3			Skip2	
Diagnosis at (m) <sup>1</sup>	0	2	2	9	0	0	0	10	13	0	3	0	2	3	0	0	14	4
% CD3 <sup>+</sup> cells <sup>2</sup>	0.3	0.1	0.6	2	0	0	1	0	27	1	<1		0	1.7	0.2	0	14	30
BMT <sup>3</sup>	MU	No	No	MU	MU	ID	H	H	H	H	No	H	H	H	CB	CB	H	H
Present age <sup>1</sup>	10y	+2m	+3m	18y	3y	1y	+20	+12	+2y	17y	+5m	+6m	+6m	+3m	5y	1y	4y	+5m
Cause of death <sup>4</sup>	AW	ADV	CMV	AW	AW	AW	GvHD	HHV6	CMV	AW	CMV	Asp	EBV	CMV	AW	AW	AW	CMV
Refs.	1				2						3			4			2	5

Deficiency	CD3 $\gamma$					CD3 $\epsilon$				CD247		TCR $\alpha$	
Family	1		2	3		1	2			1	2	1	2
Nationality	Turkey			Spain		France				Caribbean	Hawai	Pakistan	
Patient/sex	1M	2M	3M	4M	5M	1M	2F	3M	4F	1M	2F	1F	2M
Consanguineous	Yes			No		No	Yes			NR <sup>5</sup>	No	Yes	
Mutation ( <i>leaky</i> ) <sup>7</sup>	Truncation			Trunc, Het		<i>Skip7, Trunc, Het</i>	Truncation			<i>Trunc</i>	Insertion	Skip3	
Diagnosis at (m) <sup>1</sup>	3	7	48	12	48	48	5	1	0	4	10	15	6
% CD3 <sup>+</sup> cells <sup>2,6</sup>	37	27	30	10	18	63	NR <sup>5</sup>	NR	<1	21	64	21	50
BMT <sup>3</sup>	No	ID	No	No	No	No	No	No	H	H	H	H	H
Present age <sup>1</sup>	†9m	†20m	20y	†32m	30y	22y	†5m	†3m	†2m	10y	12y	?	?
Cause of death <sup>4</sup>	Sepsis	Pneum	AW	CMV	AW	AW	Pneum	CMV	ADV	AW	AW	AW	AW
Ref.	6		7	8		9	3			10	11–	12	

1- m (months); y (years). Present age in 2011;† (exitus at)

2- At diagnosis. Normal values 60-85%, includes dull and bright CD3 cells.

3- H (Haploidentical); ID (HLA-matched reative); MU (marrow unrelated donor); CB (cord blood)

4- AW (Alive and Well); ADV,CMV,EBV,HHV (viral infection); Pneum (Pneumonia); Asp (Aspergillus); GvHD (Graft vs Host Disease)

5- NR (Not reported)

6- For TCR $\alpha$  defects mostly TCR $\gamma\delta$ + T cells, few TCR $\alpha\beta$ <sup>low</sup> T cells

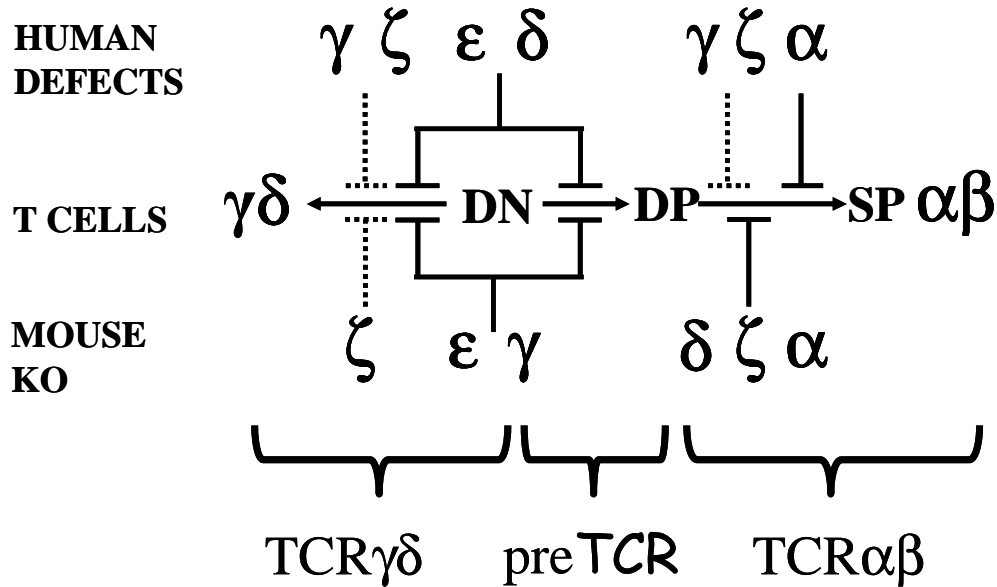
7- Leaky refers to wild type protein levels. Skip7 (exon 7 skipping), Trunc (protein truncation), Het (compound heterozygote)

**Table S2.- Summary of clinical data of CD3 $\gamma$ <sup>-/-</sup> patients at diagnosis**

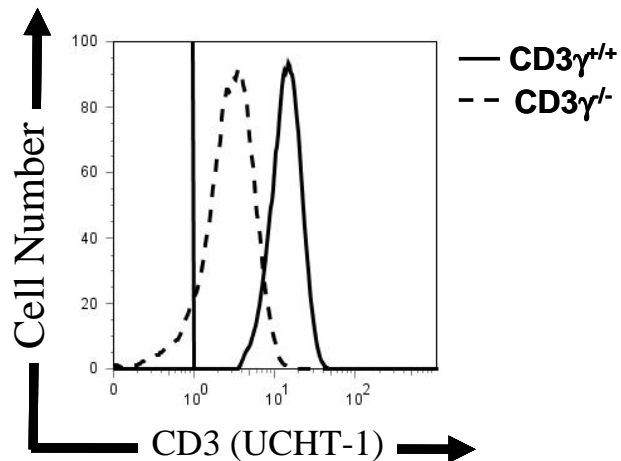
	Turkey	Spain
	Family 1	Family 3
Individual/sex	IV:4	III.2
Diagnosis at (m) <sup>1</sup>	48	48
Present age	20y	30y
Autoimmunity	psoriasis; low titer microsomal and thyroglobulin autoantibodies at diagnosis	vitiligo; low titer thyroglobulin and thyroid peroxidase autoantibodies after 17 years of age
Infections	Urinary tract infections	lymphocytary -most likely viral-meningitis
Other clinical features	asthmatic bronchitis; non-atopic hyperreactive airway; maxillary sinusitis	otitis; asthmatic bronchitis; allergic rhinitis; atopic eczema

1- m (months); y (years). Present age in 2011

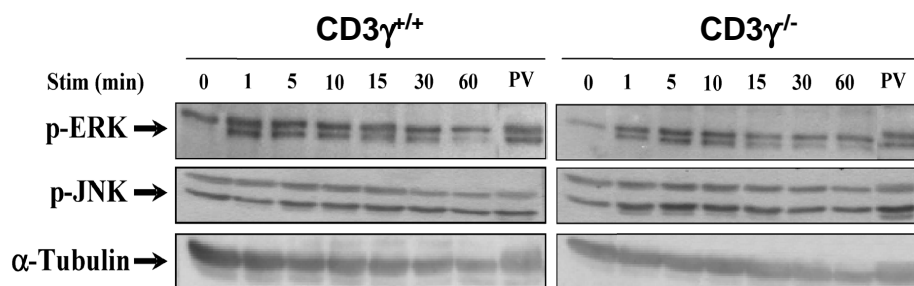
## SUPPLEMENTAL FIGURES



(S1). Leaky (---) or severe (—) block of early T cell differentiation caused by complete invariant TCR complex chain defects in humans or mice.  $\alpha\beta$  T cell development is simplified in two steps: 1) pre-TCR-mediated double-negative (DN)  $CD4^-CD8^-$  to double-positive (DP,  $CD4^+CD8^+$ ) transition; 2)  $\alpha\beta$  TCR-mediated positive/negative selection and generation of single positive (SP)  $CD4^+$  and  $CD8^+$   $\alpha\beta$  T cells.  $\gamma\delta$  T cells develop from DN thymocytes.

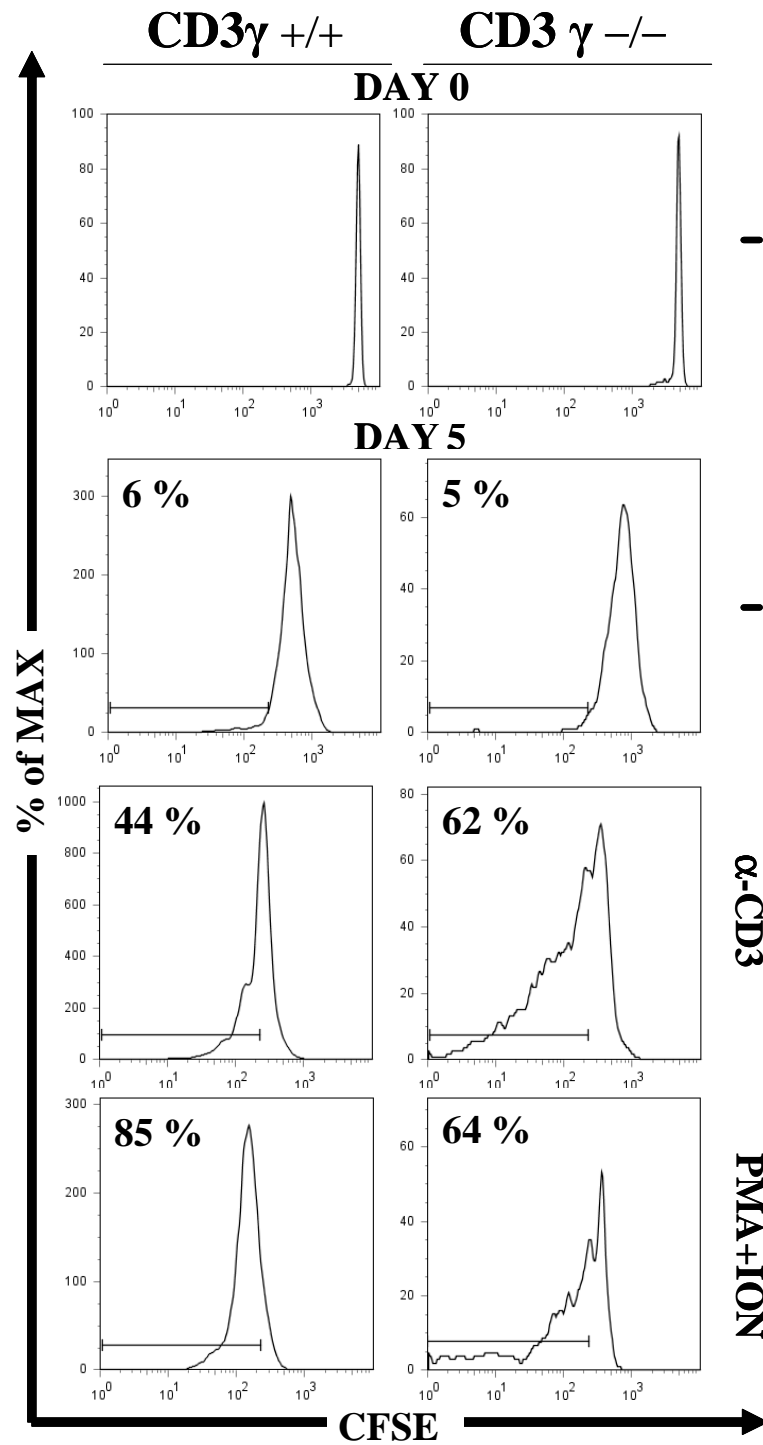


(S2). Comparative CD3 expression (antibody clone in parentheses) between human CD3 $\gamma^{-/-}$  (dashed line) and control (solid line) HVS-transformed T lymphocytes. The vertical solid line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb.



(S3). Kinetics of ERK and JNK phosphorylation following anti-CD3 stimulation. Human CD3 $\gamma^{-/-}$  and control HVS-transformed T cells were stimulated with anti-CD3 (0.025 $\mu$ g/ml) for the times indicated or with Pervanadate (PV).  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control.





**(S4). TCR function.** CFSE-labeled HVS-transformed T cells were cultured for 5 days with (+) or without (–) anti-CD3 (or PMA plus ionomycin) and analyzed for CFSE dilution.

## SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Dadi H.K., Simon A.J. and Roifman C.M. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency *N.Engl.J.Med.* 349 (2003) 1821-1828.
2. Marcus N., Takada H., Law J., Cowan M.J., Gil J., Regueiro J.R., Lopez-Granados E., Dalal J., Friedrich W., Manfred H., Grunebaum E., Hanson C., Shearer W.T. and Roifman C.M. Haematopoietic Stem Cell Transplantation for CD3 $\delta$  deficiency. Submitted (2011)
3. De Saint Basile G., Geissmann F., Flori E., et al. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1512-1517.
4. Takada H., Nomura A., Roifman C.M. and Hara T. Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur.J. Pediatr.* 164 (2005) 311-314.
5. Gil J., Busto E.M., Chean C., Díaz-Alderete A., Navarro J., Reiné J., Mencía A., Gurbindo D., Beléndez C., Gordillo I., Moreno-Pelayo M.A. Recio M.J. and Regueiro J.R. Selective  $\alpha\beta$  T lymphocyte immunodeficiency (T $\alpha\beta^-$  T $\gamma\delta^+$  B $^+$  NK $^+$ ) caused by a leaky mutation in the *CD3D* gene. Submitted (2011)
6. Recio M.J., Moreno-Pelayo M.A., Kilic S.S., Guardo A.C., Sanal O., Allende L.M., Perez-Flores V., Mencia A., Modamio-Hoybjor S., Seoane E. and Regueiro J.R. Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J. Immunol.* 178 (2007) 2556-2564.
7. Sanal O., Yel L., Ersoy F., Tezcan I. and Berkel A.I. Low expression of the T-cell receptor - CD3 complex: a case with a clinical presentation resembling humoral immunodeficiency. *Turk.J.Pediatr.* 38 (1996) 81-84.
8. Arnaiz-Villena A., Timon M., Corell A., Perez-Aciego P., Martin-Villa J. M. and Regueiro J. R. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N.Engl.J. Med.* 327 (1992) 529-533.
9. Soudais C., Villartay J. P., Deist F. L., Fischer A. and Lisowska-Grospierre B. Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat.Genet.* 3 (1993) 77-81.

10. Rieux-Laucat F., Hivroz C., Lim A., et al. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N.Engl.J.Med.* 354 (2006) 1913-1921.
11. Roberts J.L., Lauritsen J.P., Cooney M., Parrott R.E., Sajaroff E.O., Win C.M., Keller M.D., Carpenter J.H., Carabana J., Krangel M.S., Sarzotti M., Zhong X.P., Wiest D.L. and Buckley R.H.  $T^{-}B^{+}NK^{+}$  severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood.* 109 (2007) 3198-3206.
12. Morgan N.V., Goddard S., Cardno T.S., McDonald D., Rahman F., Barge D., Ciupek A., Straatman-Iwanowska A., Pasha S., Guckian M., Anderson G., Huissoon A., Cant A., Tate W.P., Hambleton S. and Maher E.R. Mutation in the TCR $\alpha$  subunit constant gene (*TRAC*) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCR $\alpha\beta^{+}$  T cells. *J.Clin.Invest.* 121 (2011) 695-702.



# A leaky mutation in *CD3D* differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a $T\alpha\beta^-T\gamma\delta^+B^+NK^+$ human SCID

Juana Gil,<sup>1</sup> Elena M. Busto,<sup>2</sup> Beatriz Garcillán,<sup>2</sup> Carmen Chean,<sup>1</sup> Maria Cruz García-Rodríguez,<sup>3</sup> Andrea Díaz-Alderete,<sup>1</sup> Joaquín Navarro,<sup>1</sup> Jesús Reiné,<sup>2</sup> Angeles Mencía,<sup>4</sup> Dolores Gurbindo,<sup>1</sup> Cristina Beléndez,<sup>1</sup> Isabel Gordillo,<sup>1</sup> Marlena Duchniewicz,<sup>5</sup> Kerstin Höhne,<sup>5</sup> Félix García-Sánchez,<sup>6</sup> Eduardo Fernández-Cruz,<sup>1</sup> Eduardo López-Granados,<sup>3</sup> Wolfgang W.A. Schamel,<sup>5</sup> Miguel A. Moreno-Pelayo,<sup>4</sup> María J. Recio,<sup>2</sup> and José R. Regueiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gregorio Marañón University Hospital, Madrid, Spain. <sup>2</sup>School of Medicine, Complutense University, i+12 and RIER, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>La Paz University Hospital, Madrid, Spain. <sup>4</sup>Ramón y Cajal University Hospital, IRYCIS and CIBERER, Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Faculty of Biology, Centre of Chronic Immunodeficiency (CCI), BIOS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg and Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany. <sup>6</sup>Blood Transfusion Centre, Madrid, Spain.

**T cells recognize antigens via their cell surface TCR and are classified as either  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  depending on the variable chains in their TCR,  $\alpha$  and  $\beta$  or  $\gamma$  and  $\delta$ , respectively. Both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCRs also contain several invariant chains, including CD3 $\delta$ , which support surface TCR expression and transduce the TCR signal. Mutations in variable chains would be expected to affect a single T cell lineage, while mutations in the invariant chains would affect all T cells. Consistent with this, all CD3 $\delta$ -deficient patients described to date showed a complete block in T cell development. However, CD3 $\delta$ -KO mice have an  $\alpha\beta$  T cell-specific defect. Here, we report 2 unrelated cases of SCID with a selective block in  $\alpha\beta$  but not in  $\gamma\delta$  T cell development, associated with a new splicing mutation in the *CD3D* gene. The patients' T cells showed reduced *CD3D* transcripts, CD3 $\delta$  proteins, surface TCR, and early TCR signaling. Their lymph nodes showed severe T cell depletion, recent thymus emigrants in peripheral blood were strongly decreased, and the scant  $\alpha\beta$  T cells were oligoclonal. T cell-dependent B cell functions were also impaired, despite the presence of normal B cell numbers. Strikingly, despite the specific loss of  $\alpha\beta$  T cells, surface TCR expression was more reduced in  $\gamma\delta$  than in  $\alpha\beta$  T cells. Analysis of individuals with this *CD3D* mutation thus demonstrates the contrasting CD3 $\delta$  requirements for  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  T cell development and TCR expression in humans and highlights the diagnostic and clinical relevance of studying both TCR isotypes when a T cell defect is suspected.**

## Introduction

T lymphocytes recognize antigens by means of a cell surface complex termed the TCR. The TCR contains 2 variable chains to bind antigens and several invariant chains to support variable chains and to transduce the signals required for T cell differentiation and antigen recognition (1). The invariant chains present in the human TCR are CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , and TCR $\zeta$  (CD247) (Figure 1A). T lymphocytes belong to either the  $\alpha\beta$  or the  $\gamma\delta$  lineage according to the types of variable chains incorporated into their TCR,  $\alpha$  and  $\beta$  or  $\gamma$  and  $\delta$ , respectively.

Mutations in TCR or CD3 genes selectively impair T cell development (2). Unless hematopoietic stem cells are replaced, the mutations frequently cause early-onset SCID and death. When a variable chain such as TCR $\alpha$  is affected, only  $\alpha\beta$  T cells are impaired, as shown recently (3). When an invariant chain is affected, both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells are either absent, as observed in CD3 $\delta$  or CD3 $\epsilon$  deficiency (4, 5), or reduced, as reported for CD3 $\gamma$  or TCR $\zeta$  deficiency (6, 7). These immunophenotypes are described as  $T^-B^+NK^+$  or  $T^+B^+NK^+$ , respectively. However, no selective  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  T cell-deficient patients have been reported

for invariant TCR chain deficiencies. We describe 2 SCID cases with severe selective  $\alpha\beta$  T lymphopenia ( $T\alpha\beta^-T\gamma\delta^+B^+NK^+$ ) caused by a leaky mutation in *CD3D* that titrated the differential CD3 $\delta$  requirements for human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lymphocyte development and TCR expression in vivo.

## Results and Discussion

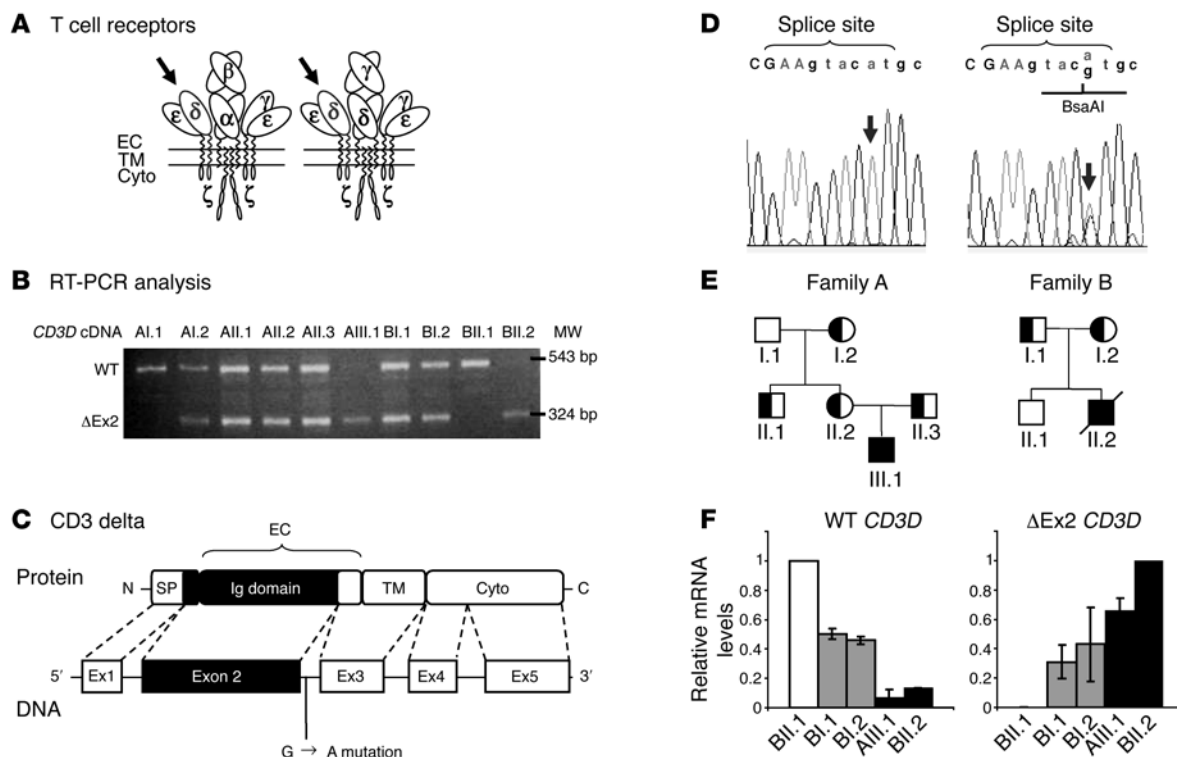
**Case reports.** Two unrelated children from nonconsanguineous Ecuadorian parents showed common clinical and immunophenotypic features. They presented at 13 (AIII.1) and 5 (BII.2) months of age with SCID features,  $T^+B^+NK^+$  phenotype, low CD3 expression, strongly impaired proliferative responses to T cell mitogens (Table 1), severe lymph node T cell depletion, and lack of activated germinal centers. Both received conditioning and haploidentical CD34 $^+$  peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation at 23 and 8 months, respectively.

Patient AIII.1 was admitted with failure to thrive, bronchopneumonia, severe diarrhea caused by strains of *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Cryptosporidium*, oral candidiasis, and atopic dermatitis. CMV and EBV were negative by PCR. Neutrophil, lymphocyte, and platelet numbers and serum and urine biochemistry were normal, including Ig levels except IgE, which was strongly increased (Table 1). NK cell function was normal, whereas T cell-dependent B cell function was impaired. Specific Abs against protein antigens were not induced upon vaccination

**Authorship note:** Juana Gil and Elena M. Busto are co-first authors. María J. Recio and José R. Regueiro are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest.* 2011;121(10):xxxx-yyy. doi:10.1172/JCI44254.



**Figure 1**

**CD3D** mutation analysis. (A) Structure of the 2 TCR that incorporate the CD3 $\delta$  chain (arrows). EC, extracellular region; TM, transmembrane region; Cyto, cytoplasmic region. (B) **CD3D** RNA RT-PCR amplification products.  $\Delta$ Ex2 bands lack exon 2 (C) **CD3 $\delta$**  protein and gene structure with localization of the G $\rightarrow$ A mutation. SP, signal peptide. (D) **CD3D** electropherograms showing the IVS2+5G $\rightarrow$ A mutation (arrow) in patient AIII.1 (left) and his father (right), and the BsaAI restriction site. Exon/intron sequences are in upper/lower case, respectively. (E) Genetic pedigrees. Circles indicate females; squares indicate males (slashed when deceased). Solid symbols denote homozygosity; half-solid symbols denote heterozygosity. (F) WT and  $\Delta$ Ex2 **CD3D** transcript levels relative to **CD3E** by quantitative RT-PCR in PBMCs using exon-specific primers and isoform-specific probes. Data represent mean  $\pm$  SD of at least 2 experiments, relative to the highest value in each data set, which is shown as 1.

and were not detected against common pathogens or autoantigens, whereas natural (IgM) Abs against polysaccharides such as isoagglutinins and heterophile Abs were normal. The patient required total parenteral nutrition, specific antimicrobials, and i.v. Ig therapy. Absence epilepsy developed at 16 months. Sclerosing cholangitis was observed before receiving a maternal transplant. At 4 years of age, he is doing well, with mixed chimerism.

Patient BII.2 was admitted with fever, prostrating diarrhea, and respiratory distress. Urine CMV and nasal adenovirus, discrete lymphopenia, and severe hypogammaglobulinemia were observed. A protein-losing enteropathy was diagnosed, and he started on i.v. Ig and prophylactic Septrin, but developed several lymphadenopathies. After an initial improvement, respiratory function deteriorated and bronchoalveolar CMV was identified, which required antivirals. He underwent paternal transplantation with full chimerism in 3 weeks, but returned to the intensive care unit with respiratory distress, hemodynamic instability, encephalopathy, and liver failure with secondary coagulopathy, and died following multiorgan failure. Necropsy evidenced a rudimentary thymus with conserved reticular structure but complete depletion of lymphocytes and Hassall corpuscles. CMV identified in the liver, brain, heart, and lung was the likely cause of death.

**A novel mutation in CD3D.** The decreased CD3 expression observed in both patients suggested a potential TCR defect. We thus analyzed **CD3** and **CD247** RNA by RT-PCR and found short **CD3D**

PCR products in several family members (Figure 1B). Sequencing revealed a complete in-frame deletion of exon 2, which encodes the extracellular Ig-like domain of CD3 $\delta$  (Figure 1C).

Exon skipping suggested a potential splicing defect. Genomic DNA sequencing detected a homozygous G-to-A mutation at position +5 in the 5' splice donor site of intron 2 (IVS2+5G $\rightarrow$ A; Figure 1D). The mutation abrogated a restriction site for the enzyme BsaAI, which was used to follow its segregation (Figure 1E). The mutation was causing the immunodeficiency, as it was not found in 140 Spanish or Ecuadorian healthy donors, and its location is strictly conserved in mammals (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI44254DS1).

The patients' parents were carriers of the same **CD3D** mutation and had a similar geographic origin, indicating that they likely shared a founder mutant allele. The analysis of polymorphic microsatellite markers spanning the **CD3** region (which contains **CD3G**, **CD3D**, and **CD3E**) confirmed the presence of a shared core haplotype associated with the mutation (Supplemental Figure 2).

From the data in Figure 1B, it seemed that some normal PCR products might be present in the patients, indicating that the mutation did not abrogate normal splicing at the **CD3D** locus, as shown in similar intronic mutations (8). To analyze **CD3D** splicing, quantitative RT-PCR relative to **CD3E** was performed. The results confirmed the presence of small amounts of WT **CD3D** transcripts in the patients (Figure 1F).



**Table 1**  
Lymphocyte studies in 2 affected children with the SCID disorder

Variables	Patient AIII.1	Patient BII.2	Normal range
Lymphocyte number/ $\mu$ l at	13 months	6 months	9–15 months
T (CD3 <sup>+</sup> )	400	787	1600–6700
B (CD19 <sup>+</sup> )	1987	2183	600–2700
NK (CD3-CD16 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup> )	636	537	180–1200
<b>T cell proliferation (cpm)<sup>A</sup></b>			
Medium	201	851	<1000
Phytohemagglutinin	2242	2562	>80,000
Anti-CD3	8020	1327	>50,000
<b>Serum Ig (mg/dl)</b>			
IgG	1170	40 <sup>B</sup>	310–1380
IgA	156	38	30–120
IgM	121	44	50–120
IgE (IU/ml)	4019	3	0–120
IgG1	957	ND <sup>B,C</sup>	430–900
IgG2	458	ND <sup>B,C</sup>	30–390
IgG3	<6.4	ND <sup>B,C</sup>	10–80
IgG4	50	ND <sup>B,C</sup>	10–65
<b>Functional Abs</b>		ND <sup>B,C</sup>	
Natural Abs (titer)			
Heterophile Abs	1/256		$\geq 1/64$
Isohemagglutinins (anti-B)	1/16		$\geq 1/8$
Infectious specificities <sup>D</sup>	Neg		–
Vaccination responses	Before/After		After
Hepatitis B (IU/ml)	NAV <sup>C</sup> / 0		>10
Tetanus toxoid (IU/ml)	0.01 / 0.03		0.04–3.92
Influenza (HI) <sup>E</sup>	8/16		>32
<b>NK cell cytotoxicity (% lysis)<sup>F</sup></b>		ND <sup>C</sup>	
100:1	34		30–86
50:1	21		20–84
12:1	8		1–57

<sup>A</sup>H<sup>3</sup>-thymidine uptake in response to mitogens. <sup>B</sup>Protein-losing enteropathy. <sup>C</sup>Not done or not available (neonatal vaccination). <sup>D</sup>IgG anti-CMV, EBV, HSV, VZV, HIV, HAV, rubella, measles, toxoplasma, and IgE anti-aspergillus. <sup>E</sup>Hemagglutination inhibition. <sup>F</sup>At the indicated effector/target ratios.

From these results, we concluded that a homozygous IVS2+5G→A mutation strongly impaired (around 10-fold), but did not abrogate, normal *CD3D* splicing in both patients.

**Reduced CD3 $\delta$  protein.** The small levels of WT *CD3D* transcripts were found to be sufficient to encode for half-normal levels of WT CD3 $\delta$  proteins in the patients' T cells as shown in family B by Western blotting (Figure 2) or intracellular flow cytometry (Supplemental Figure 3A). In contrast, the dominant  $\Delta$ Ex2 *CD3D* transcripts did not give rise to detectable levels of the predicted headless CD3 $\delta$  chain, despite being readily detected after transfection in non-T cells (Figure 2B).

We cannot exclude that small amounts of  $\Delta$ Ex2 CD3 $\delta$  might be expressed below the detection limit of Western blotting. However, when overexpressed in *Drosophila* cells,  $\Delta$ Ex2 did not compete with WT CD3 $\delta$  in the formation of a TCR complex (Supplemental Methods and Supplemental Figure 4).

From these studies, we concluded that the immunodeficiency was associated with reduced levels of normal CD3 $\delta$ .

**Immunological characteristics.** The human CD3 $\delta$  chain is incorporated into both TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  (Figure 1A). To establish how the *CD3D* mutation affected lymphocyte differentiation, the

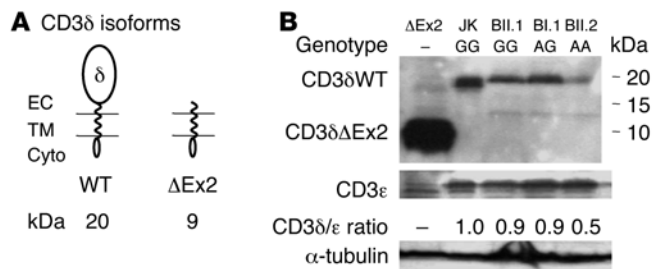
numbers of  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\delta$  T cells were determined in both patients (Figure 3A). The results showed a severe selective reduction in peripheral blood  $\alpha\beta$  T lymphocyte numbers (both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>; Supplemental Figure 5), close to 10-fold compared with the median value of healthy age-matched controls. In contrast,  $\gamma\delta$  T cells as well as B and NK lymphocytes were detected in normal numbers (T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ <sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> phenotype; Figure 3A and Table 1). A possible role for CMV in  $\gamma\delta$  T cell predominance was proposed in some SCID reports (9) but not in others (10). However, CMV-induced  $\gamma\delta$  T expansion was excluded in patient AIII.1.

The reduction caused by the *CD3D* mutation in  $\alpha\beta$  but not  $\gamma\delta$  T lymphocyte numbers suggested a differential CD3 $\delta$  requirement for TCR expression or function in  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  T cells. Counterintuitively, TCR expression was around 2-fold lower in  $\gamma\delta$  than in  $\alpha\beta$  T cells from the patients using different TCR- or CD3-specific mAbs, both in primary (Figure 3B) and in cultured T cells (Supplemental Figure 3B). TCR downregulation after engagement by anti-CD3, however, was similar in both T cell lineages (Supplemental Figure 6A). In contrast, early activation events such as CD69 or CD25 induction were strongly reduced (Figure 3C and Supplemental Figure 6, B and C).  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells were nevertheless capable of normal anti-CD3- or phytohemagglutinin-induced short-term proliferation on a per-cell basis (5 days; Supplemental Figure 6D). This was confirmed in culture using allogeneic feeder cells (Figure 3D). However, after day 25 in the same cultures,  $\alpha\beta$ , but not  $\gamma\delta$ , T cells showed impaired growth relative to a control. Therefore, the *CD3D* mutation impaired TCR expression and several functions in  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells, albeit with some contrasting effects: lower TCR expression by  $\gamma\delta$  T cells but lower in vitro long-term survival of  $\alpha\beta$  T cells. CD3 $\delta$  has been reported to bind less strongly to the TCR $\gamma\delta$  than to the TCR $\alpha\beta$  heterodimer (11), offering a potential mechanism for the observed differential surface levels of TCR in  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cells when CD3 $\delta$  is reduced.

The thymus was normal in size at diagnosis (Supplemental Figure 7). To study its function, several studies were performed, including analyses of recent thymic emigrants defined as CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> cells, CD45RA<sup>+</sup> (naive) and CD45RO<sup>+</sup> (memory) T cells, CD25 expression; TCR $\beta$  clonality, and TCRV $\beta$  usage (Supplemental Figures 8 and 9). The results indicated that the patients' thymuses produced very few  $\alpha\beta$  T lymphocytes, and most of these had differentiated into effector memory T cells with an activated phenotype and an oligoclonal TCRV $\beta$  repertoire. They may have contributed to the observed in vivo Th2 features in patient AIII.1 (hyper-IgE, eosinophilia, and atopic dermatitis). Similar Th2 immunopathology has been observed in lymphopenic patients with Omenn-like syndrome associated with several primary immunodeficiencies (12) and in mice with partial T cell immunodeficiency (13).

These results indicated that the *CD3D* splicing mutation strongly impaired  $\alpha\beta$ , but not  $\gamma\delta$ , T lymphocyte selection in the thymus, resembling the phenotype of CD3 $\delta$ -KO mice (14). In contrast,



**Figure 2**

CD3δ protein analysis. (A) WT CD3δ and the predicted truncated isoform (ΔEx2). (B) Western blotting analysis of CD3δ isoforms in lysates from ΔEx2-transfected 293T cells, Jurkat cells (JK), or T cell lines with the indicated *CD3D* IVS2+5 genotypes using APA1/2 (anti-human CD3δ cytoplasmic tail), anti-CD3ε, or anti-tubulin. The numbers under each lane indicate CD3δWT band intensity relative to CD3ε.

human complete CD3δ immunodeficiencies uniformly lack all T cells (4, 5). Therefore, the leaky mutation, which we believe to be novel, reveals that human αβ and γδ T lymphocytes have differential CD3δ requirements for selection that have not been described for other invariant chains (CD3γ, CD3ε, or TCRζ; Supplemental Table 1). The Tαβ<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> phenotype has been reported recently in 2 children with TCRα deficiency (3). However, those patients remained relatively healthy for 6–7 years on antibiotic prophylaxis before transplantation; they had activated germinal centers and specific Ab responses against vaccines and autoantigens, likely due to γδ T cell help by homology with the mouse model. The leaky CD3δ

SCID patients reported here required very early transplantation (before 1–2 years), lacked germinal centers, and showed very poor T cell-dependent B cell function, perhaps due to the signaling impairment observed also in their γδ T cells (Figure 3C). Thus, CD3δ levels are sufficient for selection, but not for normal function of γδ T cells, as described for CD4<sup>+</sup> T cells in Zap70 SCID patients (2).

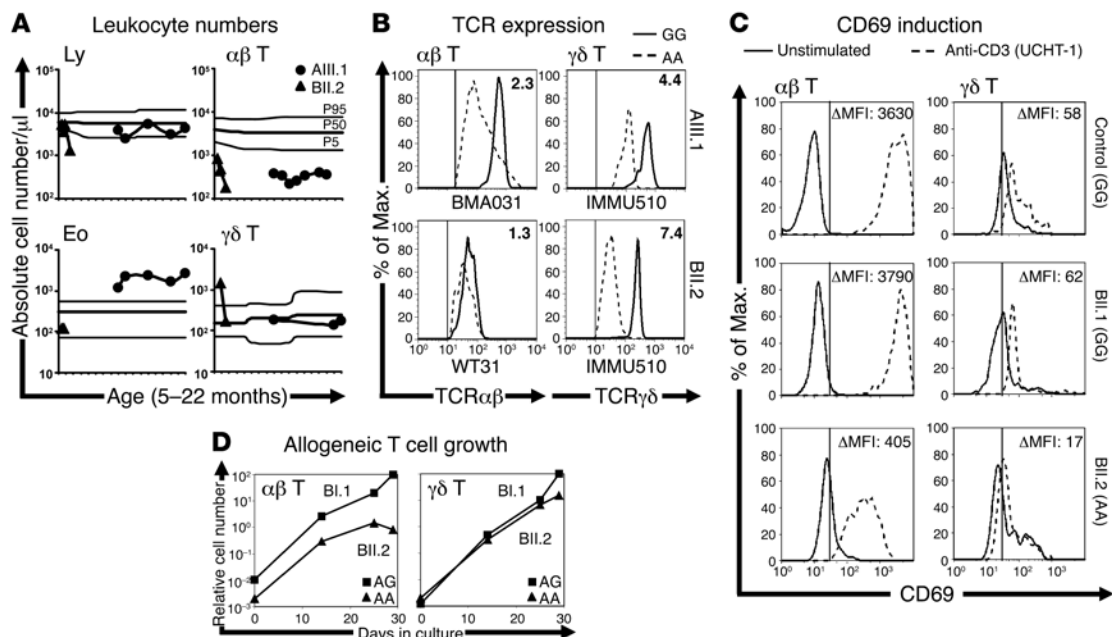
Two mechanisms may be proposed to explain the selective effect of low CD3δ levels in αβ T lymphocyte development. One is impaired assembly or signaling of the immature precursor of the TCRαβ termed the pre-TCR (15). The second one is impaired signaling through the mature TCRαβ due to reduced interactions of CD3δ with an evolutionarily conserved motif in the TCRα chain membrane-proximal constant region termed the α-chain connecting peptide (16).

Together, the results showed that the leaky *CD3D* mutation reduced CD3δ chains, which in turn blocked αβ rather than γδ T cell selection. In mature T cells, TCRγδ expression was more impaired than TCRαβ expression, but early signaling through both was similarly impaired.

## Methods

Further information can be found in Supplemental Methods.

**Mutation detection.** *CD3* amplimers were generated by RT-PCR of PBMC RNA with specific primers (Supplemental Tables 2 and 3). *CD3D* exons and flanking intronic sequences were amplified from leukocyte DNA by PCR using specific primers and sequenced following standard techniques. Screening for the IVS2+5G→A mutation was performed by RFLP using *Bsa*AI (New England Biolabs). Ecuadorian DNA samples were provided by Antonio Arnaiz-Villena (Complutense University).

**Figure 3**

T lymphocyte analysis. (A) Absolute cell numbers in patients plotted as a function of age in comparison with the normal age-matched distribution (P5, P50, and P95). The leukocyte subsets are lymphocytes (Ly), eosinophils (Eo), αβ T (CD4<sup>+</sup>+CD8<sup>bright</sup>), and γδ T (11F2<sup>+</sup>) cells. (B) TCRαβ and TCRγδ cell surface expression in primary lymphocytes from the patients (dashed lines, AA genotype) in comparison with controls (solid lines, GG genotype), measured using the indicated TCRαβ- and TCRγδ-specific mAb. The numbers in each histogram indicate MFI ratios between control and patient. (C) CD69 induction (geometric MFI increments) after 24 hours in anti-CD3-stimulated (dashed lines) versus unstimulated (solid lines) primary αβ T (CD4<sup>+</sup>) or γδ T (IMMU510<sup>+</sup>) lymphocytes with the indicated genotypes. (D) Patient T cell growth in feeder cell cultures expressed as a percentage of carrier BI.1 T cell numbers.



**Quantitative PCR.** TaqMan PCR of PBMC cDNA was done using CD3D WT- or ΔEx2-specific primers and probes (Supplemental Table 4). Samples were normalized to the Ct of CD3E-specific primers and probe 49 from the Universal ProbeLibrary Human (Roche) and to the highest value in each data set, which is shown as 1.

**Transfections and Western blotting.** 293T cells were transiently transfected using lipofectamine (Invitrogen) with 2 μg of plasmid pIRES-GFP1a (Invitrogen) containing ΔEx2 CD3D cDNA, lysed and analyzed by Western blotting, together with cultured T cells, using APA1/2 (mouse anti-CD3δ cytoplasmic tail IgG mAb; provided by Balbino Alarcón, Centro de Biología Molecular, Madrid, Spain) or M20epsilon (goat anti-CD3ε IgG; Santa Cruz Biotechnology Inc.).

**Immunological investigations.** Lymphocyte phenotype was determined by flow cytometry using anti-CD3 (Leu4/SK7), anti-CD69 (L78), anti-CD19 (SJ25C1), anti-CD16 (73.1), anti-CD56 (NCAM16.2), and anti-TCRγδ (11F2) from BD Biosciences; and anti-TCRαβ (BMA031 or WT31), anti-TCRγδ (IMMU510), anti-CD4 (13B8.4), and anti-CD8 (B9.11) from Beckman Coulter Immunotech. T cell function was tested by standard overnight H<sup>3</sup>-thymidine uptake assays (1 μCi/well) by culturing 10<sup>5</sup> PBMCs with phytohemagglutinin (1 μg/ml; Sigma-Aldrich) or plastic-bound anti-CD3 (10 μg/ml UCHT-1 from BD) for 72 hours. NK cell function was tested by standard <sup>51</sup>Cr release assays using PBMCs as effectors and K562 cells as targets. Specific lysis was calculated from cpm as 100 × (sample)/(maximum), after correcting for blank measurements.

T cell lines were generated from PBMCs and expanded weekly with irradiated allogeneic feeder cells (PBMCs and EBV-transformed B cells) at 1:5:5 ratios and final 10<sup>6</sup> cells/ml in IMDM medium (PAA) with 0.1 μg/ml phytohemagglutinin (only at day 0; Sigma-Aldrich), 40 IU/ml rIL-2 (provided by Craig W. Reynolds, Frederick Cancer Research and Development

Center, NCI, NIH, Frederick, Maryland, USA), 10% AB<sup>+</sup> human serum, and 1% glutamine (Gibco; Invitrogen).

**Study approval.** The study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and approved by the Hospital Clínico Research Ethics Committee, Madrid, Spain. All participants or their guardians provided informed consent for the collection of samples and subsequent analyses.

**Statistics.** Bar graph data represent mean ± SD. For proliferation and cytotoxicity, median values of triplicates were used.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish NIH (ISCIII – PI080921, PI060057, PI080045, RIER), Ministry of Health (2010 Cohesion Fund for Rare Diseases), Ministry of Science (SAF2011-24235), Fundación Mutua Madrileña, and the Deutsche-Forschungsgemeinschaft (EXC294/BIOSS, SFB620B6). We thank Bruno Hernández, Verónica Pérez-Flores, Alberto C. Guardo, Edgar Fernandez-Malavé, Pilar Perez Breña (National Microbiology Center), and Pieter C. M. Res (University of Amsterdam) for technical support and comments.

Received for publication January 18, 2011, and accepted in revised form August 3, 2011.

Address correspondence to: José R. Regueiro, Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34913941642; Fax: 34913941641; E-mail: regueiro@med.ucm.es.

- Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76(2):263–274.
- Notarangelo LD, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiencies (PID) Expert Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(6):1161–1178.
- Morgan NV, et al. Mutation in the TCRα subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRαβ<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest*. 2011;121(2):695–702.
- Dadi HK, Simon AJ, Roifman CM. Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2003;349(19):1821–1828.
- de Saint Basile G, et al. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1512–1517.
- Siegers GM, et al. J Different composition of the human and the mouse gammadelta T cell receptor explains different phenotypes of CD3gamma and CD3delta immunodeficiencies. *J Exp Med*. 2007;204(11):2537–2544.
- Roberts JL, et al. T-B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood*. 2007;109(8):3198–3206.
- Wada T, et al. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. *Blood*. 2008;112(5):1872–1875.
- Ehl S, et al. A variant of SCID with specific immune responses and predominance of γδ T cells. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3140–3148.
- Enders A, et al. A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV. *J Immunol*. 2006;176(8):5060–5068.
- Alibaud L, Arnaud J, Llobera R, Rubin B. On the role of CD3d chains in TCRgd/CD3 complexes during assembly and membrane expression. *Scand J Immunol*. 2001;54(1–2):155–162.
- Ozcan E, Notarangelo LD, Geha RS. Primary immune deficiencies with aberrant IgE production. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(6):1054–1062.
- Liston A, Enders A, Siggs OM. Unravelling the association of partial T-cell immunodeficiency and immune dysregulation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):545–558.
- Dave VP, et al. CD3δ deficiency arrests development of the αβ but not the γδ T cell lineage. *EMBO J*. 1997;16(6):1360–1370.
- Yamasaki S, Saito T. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends Immunol*. 2007;28(1):39–43.
- Bäckström BT, Müller U, Hausmann B, Palmer E. Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science*. 1998;281(5378):835–838.



# **Inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo**

## **TCR/CD3**

Reiné J, Recio MJ, Regueiro JR

Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

Correspondencia a:

Dr. José Ramón Regueiro

Inmunología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
28040 Madrid  
TEL: +34 91 394 16 42  
FAX: +34 91 394 16 41  
EMAIL: [regueiro@med.ucm.es](mailto:regueiro@med.ucm.es)

# **Primary immunodeficiencies associated to TCR/CD3 complex**

Reiné J, Recio MJ, Regueiro JR

Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

## **ABSTRACT**

The human primary immunodeficiencies associated to TCR/CD3 complex are very rare autosomal recessive disorders, in which most of the patients cannot establish an appropriate immune response, leading to an increased susceptibility to infections or even the death in infancy. Remarkable progress have been made in the understanding of the structure, the function, the clinical prognosis and treatment since the first human CD3 $\gamma$  immunodeficiency was discovered by Regueiro JR and colleagues in 1986. Here, we review the recent advances described for these immunodeficiencies, providing new insights regarding the role of the TCR/CD3 complex for assembly, signal transduction and new strategies for diagnosis based on immunophenotyping and molecular analysis for these rare primary immunodeficiencies.

## **KEY WORDS**

TCR complex, T cells, CD3, Immunodeficiencies.

# **Inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo TCR/CD3**

Reiné J, Recio MJ, Regueiro JR

Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

## **RESUMEN**

Las inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo TCR/CD3 son enfermedades autosómicas recesivas muy raras en las que la mayoría de los pacientes no puede establecer una respuesta inmune apropiada, dando lugar a una mayor susceptibilidad a las infecciones o incluso la muerte en la infancia. Se han logrado avances significativos en la comprensión de la estructura, la función, el pronóstico clínico y su tratamiento desde que fue descubierta la primera inmunodeficiencia humana de CD3 $\gamma$  por Regueiro JR y colaboradores en 1986. Aquí, mostramos una revisión de los recientes avances descritos para estas inmunodeficiencias, proporcionando nuevos conocimientos sobre el papel del complejo TCR/CD3 en el ensamblaje, la transducción de señales y las nuevas estrategias de diagnóstico basadas en el inmunofenotipo y el análisis molecular para estas raras inmunodeficiencias primarias.

## **PALABRAS CLAVE**

Complejo TCR, Células T, CD3, Inmunodeficiencias

# **Human $\alpha\beta$ TCR surface expression and function/signaling is differentially affected by knockdown of CD3 $\delta$ and CD3 $\gamma$**

Reiné J<sup>1,2</sup>, Recio MJ<sup>1,2</sup>, Garcillán B<sup>1,2</sup>; Fernández-Malavé E<sup>1</sup>, and Regueiro JR<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

\*These authors contributed equally to this work

**Address correspondence to: Dr. José R. Regueiro, Immunología, Facultad de Medicina,**

**Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34913941642. Fax:**

**+34913941641. E-mail address: [regueiro@med.ucm.es](mailto:regueiro@med.ucm.es)**

Running title: *Selective effects of Knock-Down of CD3 chains in the  $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex*

**Key words:** T Cells, Cell Surface Molecules, T Cell Receptors, siRNA

Total character count:

**ABSTRACT**

CD3 $\gamma$  and CD3 $\delta$  are the most homologous chains of the TCR/CD3 complex. However, only, CD3 $\delta$  shows a non-redundant role in early human T lymphocyte differentiation: CD3 $\delta$ , but not CD3 $\gamma$ , immunodeficiencies completely lack peripheral blood T cells. It is still unknown if the contribution of CD3 $\delta$  to TCR-mediated lymphocyte human selection is structural or functional. Here, we addressed this question by analyzing TCR/CD3 expression and function in Jurkat T cells after specific siRNA dependent CD3 $\gamma$  or CD3 $\delta$  silencing. Our results showed that CD3 $\delta$  is essential to the normal TCR/CD3 expression, in contrast CD3 $\gamma$ KD showed an affected antibody binding and impaired down-modulation of the TCR/CD3 complex. Upon CD3 stimulation, the calcium flux and the induction of CD69 it was CD3 $\gamma$  or CD3 $\delta$  independent, respectively. These findings indicate that CD3 $\delta$  shows a non-redundant contribution in the expression of the TCR/CD3 complex, and this would explain its differential role in the human T lymphocyte differentiation.

# Differential antibody binding to the surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation

Nineth E. Rossi<sup>1</sup>, Jesús Reiné<sup>1</sup>, Miguel Pineda-Lezami<sup>2</sup>, Manuel Pulgar<sup>2</sup>, Néstor W. Meza<sup>3</sup>, Mahima Swamy<sup>4</sup>, Ruth Risueno<sup>2</sup>, Wolfgang W. A. Schamel<sup>4</sup>, Pedro Bonay<sup>2</sup>, Edgar Fernández-Malavé<sup>1,2</sup> and José R. Regueiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Molecular Immunology, Max Planck-Institute for Immunobiology and Faculty of Biology, University of Freiburg, Freiburg, Germany

**Keywords:** cell surface molecules, T cells, TCRs

## Abstract

We have previously shown that the surface  $\alpha\beta$  T cell antigen receptor (TCR)-CD3 complex borne by human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes can be distinguished using mAbs. Using two unrelated sets of antibodies, we have now extended this finding to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 of seven additional mammalian species (six non-human primates and the mouse). We have also produced data supporting that differential glycosylation of the two main T cell subsets is involved in the observed TCR-CD3 antibody-binding differences in humans. First, we show differential lectin binding to human CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, particularly with galectin 7. Second, we show that certain lectins can compete differentially with CD3 mAb binding to human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Third, *N*-glycan disruption using swainsonine was shown to increase mAb binding to the  $\alpha\beta$ TCR-CD3. We conclude that the differential antibody binding to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is phylogenetically conserved and associated with differential glycosylation. The differences may be exploited for therapeutic purposes, such as T cell lineage-specific immunosuppression of graft rejection. Also, the impact of glycosylation on CD3 antibody binding requires a cautious interpretation of CD3 expression levels and T cell numbers in clinical diagnosis.

## Introduction

$\alpha\beta$  T lymphocytes recognize peptide-MHC ligands by means of a multimeric protein ensemble termed the  $\alpha\beta$  T cell antigen receptor (TCR)-CD3 complex. This structure is composed of a variable  $\alpha\beta$  TCR dimer which binds antigens and three invariant dimers (CD3 $\gamma\epsilon$ ,  $\delta\epsilon$  and  $\zeta\zeta$ ) which are involved in TCR-CD3 surface transport, stabilization and signal transduction (1). The minimal stoichiometry, therefore, is believed to be  $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta_2$ , although larger clusters of this basic monovalent TCR-CD3 unit have been observed in certain conditions (2). The ratio of monovalent to multivalent TCR-CD3 varies between different T cell clones and lines, even when the receptors have the same specificity (3).

Mature CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells differ sharply in their MHC ligands, but their TCR-CD3 complex is believed to be qualitatively identical. The fact that most TCR-CD3-specific mAb bind to CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells better than to CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells was thus taken as evidence of quantitative differences in the number of TCR-CD3 complexes on the surface of each cell type (4). Unexpectedly,  $\alpha\beta$ TCR-CD3 expression was shown to be more impaired in CD8<sup>+</sup> than in CD4<sup>+</sup> cells when CD3 $\gamma$  (5, 6) or CD3 $\delta$  (7) was absent. These observations were followed by the description of conformational and biochemical differences in the TCR-CD3 complex between CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> CD3 $\gamma$ -deficient ( $\gamma^-$ ) T lymphocytes (8).

## 2 Conserved lineage-associated variation in $\alpha\beta$ TCR-CD3

More recently, we reported that a CD3-specific mAb termed RW28C8 bound normal human CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T lymphocytes better than CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells (9). Collectively, these results are not consistent with the quantitative interpretation but, rather, with the existence of constitutive differences (i.e. qualitative) in antibody binding to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complexes borne by CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells. These differences could be due to the existence of T cell lineage-associated differences in the way the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex is assembled, glycosylated, trimmed or topologically pre-clustered at the cell surface.

In the present study, we have extended our observations to other mammalian species. Additionally, we have addressed the hypothesis of differential glycosylation of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells by studying surface lectin binding and competition with CD3-specific mAb. Lastly, we have shown that the TCR-CD3 complexes from both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells co-exist in monovalent and multivalent complexes and the ratio between them appears to be similar. This excludes that different degrees of pre-clustering were the cause for differential antibody accessibility.

### Methods

#### Cells

Human venous blood was obtained with informed consent from healthy donors (20 to 34 years old). Venous blood from non-human primates was obtained from anesthetized healthy adult animals belonging to *Cercopithecidae* (*Papio* sp. or baboon, *Macaca sylvanus* or barbary macaque and *Mandrillus sphinx* or mandrill), *Hominidae* (*Gorilla gorilla* and *Pan troglodytes* or chimpanzee), *Hylobatidae* (*Hylobates lar* or gibbon) and *Lemuridae* (*Eulemur fulvus mayottensis* or brown lemur) families. Heparinized blood or lymphoid tissue cells were obtained from 4- to 12-week-old wild-type ( $\gamma^+$ ) or CD3 $\gamma$ -deficient ( $\gamma^-$ ) C57BL/6 euthanized mice (6). The organs were placed in complete RPMI 1640 cell culture medium (Gibco Invitrogen; Paisley, Scotland, UK), washed and macerated through a 70- $\mu$ m cell strainer to remove aggregates. To remove adherent cells, thymocytes were incubated in plastic flasks with RPMI 1640 + 10% FCS for 30 min at 37°C. Splenocytes were re-suspended in 2 ml 0.83% w/v NH<sub>4</sub>Cl to lyse erythrocytes.

PBMCs were isolated and in some cases activated for 12–18 h with 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> PHA as described (10). Constitutively activated *Herpesvirus saimiri*-transformed human T cells were obtained and grown as described (11). This study was approved by the Institutional Review Board of Complutense University.

#### Antibodies

The following unconjugated mAbs were used for human and, where indicated, non-human primate samples (clone names in parentheses): anti-CD3 $\epsilon\gamma/\delta$  (UCHT1 and IOT3b) from Coulter Immunotech, Marseille, France; anti-CD3 $\epsilon$  (X35) from D. Bourel, C.R. de Transfusion Sanguine, Rennes, France; anti-CD3 $\epsilon$  (2Ad2 and RW28C8) from E. L. Reinherz, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA; anti-CD3 $\epsilon$  (SPV.T3b) from J. E. de Vries, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands; anti-CD3 (F101.01) and

anti-CD3 $\epsilon\gamma/\delta$  (OKT3) from Bent Rubin, CHU de Purpan, Toulouse, France; anti-CD3 $\epsilon$  (Cris7) from R. Vilella, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; anti-CD3 (WT31), anti-TCR $\alpha\beta$  (BMA031), anti-CD43 (1G10) and anti-CD3 $\epsilon$  (SP34) from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-CD3 $\epsilon\gamma/\delta$  (Leu4/SK7) and anti-TCRC $\beta$ 1 (JOV11) from B. Alarcon, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), University Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain; anti-CD18 (TS2/16 and Lia 3/2) from C. Cabañas, Instituto de Farmacología y Toxicología Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, University Complutense, Madrid, Spain and anti-CD3 (MEM57) from V. Horejsi, Institute of Molecular Genetics, – Academy of Sciences, Praha, Czech Republic. For these mAb, PE-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) or IgM ( $\mu$ ) secondary antibodies from Caltag (Burlingame, CA, USA), Coulter Immunotech (Miami, FL, USA) or Southern Biotechnology Associates were used. Several conjugated mAbs were used for human samples (clone names in parentheses): anti-CD4PE, FITC or PECy5 (13B8.2) and anti-CD8PE, FITC or PECy5 (B9.11), anti-TCRV $\beta$ 17PE (E17.5F3), anti-TCRV $\beta$ 2FITC (MBB2D5), anti-TCRV $\beta$ 3PE (CH92) and TCRV $\beta$ 8.1 + 2PE (56C5) from Coulter Immunotech; anti-CD69FITC (L78), anti-CD3PE (Leu4/SK7) and anti-CD5PE (UCHT2) from BD Pharmingen. RW28C8 was derived by immunization and screening with a CD4<sup>+</sup> ragweed-specific T cell clone (R. E. Hussey and E. L. Reinherz, personal communication).

For non-human primate samples, the following conjugated mAbs were used (clone names in parentheses): anti-CD4FITC (M-T477) and anti-CD8 $\alpha$ PECy5 (RPA-T8) from BD Pharmingen. The Rhesus (*Macaca mulatta*)-specific anti-CD3 mAb FN18 was kindly donated by D. Neville (Laboratory of Molecular Biology, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

The following mAbs were used for mouse samples (clone names in parentheses): anti-CD4PE or FITC (L3T4), anti-CD8PE or FITC (Ly2), anti-TCR $\beta$ FITC (H57-597), anti-CD3 $\epsilon$ -biotin (145-2C11), anti-CD3 $\epsilon$  purified from hamster (500A2), anti-LFA-1PE (CD11a), anti-CD3PE (17A2) and a hamster or rat IgG isotype control from Pharmingen (San Diego, CA, USA); anti-CD3 purified from rat (KT3) was purchased from Serotec (Oxford, UK), anti-intracellular CD3 $\epsilon$  (iCD3 $\epsilon$ , APA1/1) and CD3 $\delta$  (iCD3 $\delta$ , APA1/2) were obtained from B. Alarcon (CBMSO, CSIC, Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid, Spain). The secondary reagents (goat anti-hamster FITC, goat anti-rat FITC and streptavidin-FITC) were also from Pharmingen.

#### Lectins

Several lectins were used to detect leucocyte cell surface glycans. Biotinylated peanut agglutinin from *Arachis hypogaea* (PNA), FITC-labeled *Sambucus nigra* (SNA, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bark lectin, and FITC-labeled *Griffonia simplicifolia* lectin I (IB4, used as a negative control) from Vector Laboratories; FITC-labeled wheat germ lectin *Triticum vulgaris* (WGA) and FITC-labeled red kidney bean *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) from Sigma (St Louis, MO, USA); Alexa fluor 488-labeled soybean agglutinin *Glycine max* (SBA) from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Recombinant human FITC-labeled galectins (Gals) Gal-1, -4, -7

glutathione-S-transferase (GST) and -8GST were prepared as described (12–16). Recombinant human FITC-labeled Gal-3 was kindly donated by A. Karlsson (The Phagocyte Research Laboratory, Department of Rheumatology and Inflammation Research, Goteborg University, Sweden).

To analyze lectin binding to PBMC,  $10^5$  cells in 100  $\mu$ l PBS-BSA (PBS, 1% bovine serum albumin, 0.05% sodium azide) were exposed to 2–4  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  conjugated lectins ( $\pm 0.1$  M  $\beta$ -lactose where indicated) for 15 min at 4°C in a 96-well flat-bottom plate. Cells were washed twice in PBS-BSA and stained with anti-CD4PE and anti-CD8PECy5 mAb. Flow cytometry of at least 20 000 cells was done on an Epics Elite Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Isolectin IB4-FITC in PBS 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  or GST-FITC was used as irrelevant controls.

For lectin competition experiments, four-step stainings were performed. Briefly, human PBMCs were pre-incubated with increasing concentrations of each lectin for 15 min at 4°C, washed twice in PBS-BSA, incubated with anti-human TCR-CD3 mAb for 15 min at 4°C, washed twice in PBS-BSA, stained with anti-mouse IgG-PE (1/80) by incubation for 20 min at 4°C, washed twice in PBS-BSA and incubated with anti-CD4PECy5 or anti-CD8PECy5.

For N-glycosylation inhibition, Jurkat T cells were incubated for up to 3 days with 5  $\mu$ M swainsonine (Sigma) and monitored for deglycosylation using PHA-FITC or stained with anti-TCR-CD3 mAb.

#### Flow cytometry

Electronic gates were used to identify  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^{\text{bright}}$  lymphocytes, which are  $>99\%$   $\alpha\beta$ TCR-CD3 $^+$  (as measured with BMA031) and  $<0.2\%$   $\gamma\delta$ TCR-CD3 $^+$  (as measured with 11F2 or Inmuno510, data not shown). Human  $\alpha\beta$ TCR-CD3-associated epitopes within  $\text{CD4}^+$  or  $\text{CD8}^{\text{bright}}$  subsets were analyzed by three-color flow cytometry on PBMC as described elsewhere (11). Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were stained with CD3- or TCR-specific mAb (30 min, 4°C), washed twice in PBS-BSA and incubated for 20 min at 4°C with anti-mouse IgG-PE, followed by two washes in PBS-BSA and a subsequent incubation for 20 min at 4°C with anti-CD4FITC and anti-CD8PECy5. For comparative stainings, the mean fluorescence intensity (MFI) was used. Samples were analyzed as above.

For other primates, whole blood samples were analyzed. Briefly, 100  $\mu$ l of thoroughly mixed blood was incubated for 15 min at 4°C in 12  $\times$  75 mm polypropylene tubes, with CD3- or TCR-specific mAb, and processed as above. After incubation, 2.5 ml of lysis solution (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA) was added, the tubes were incubated for 10 min at room temperature ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) in the dark and centrifuged for 10 min at 4°C per 200 g. The cell pellets were re-suspended in 500  $\mu$ l of PBS-BSA before analysis as above.

For mouse samples,  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells were washed and re-suspended in PBS-BSA with 20  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  mouse IgG, incubated for 20 min at 4°C and washed twice with PBS-BSA. Two-color stainings were performed with purified hamster anti-mouse mAb followed by anti-hamster Ig-FITC (20 min, 4°C) and two washes with PBS-BSA before anti-CD4PE or anti-CD8PE stainings. Control stainings with secondary antibody only were performed routinely. Twenty thousand

events from each sample were analyzed in a FACScan using the CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Intracellular stainings were performed as described previously (17). Briefly, lymph node cells from 6-week-old C57BL/6 mice were directly stained with PE-labeled anti-CD4 or anti-CD8 and fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm kit (Pharmingen). Cells were then incubated with 4  $\mu$ g  $\text{ml}^{-1}$  biotin-labeled APA1/1 or APA1/2 for 30 min on ice, stained with streptavidin-FITC and analyzed by flow cytometry in a FACSCalibur.

#### Membrane preparation, blue native-PAGE and immunoblotting

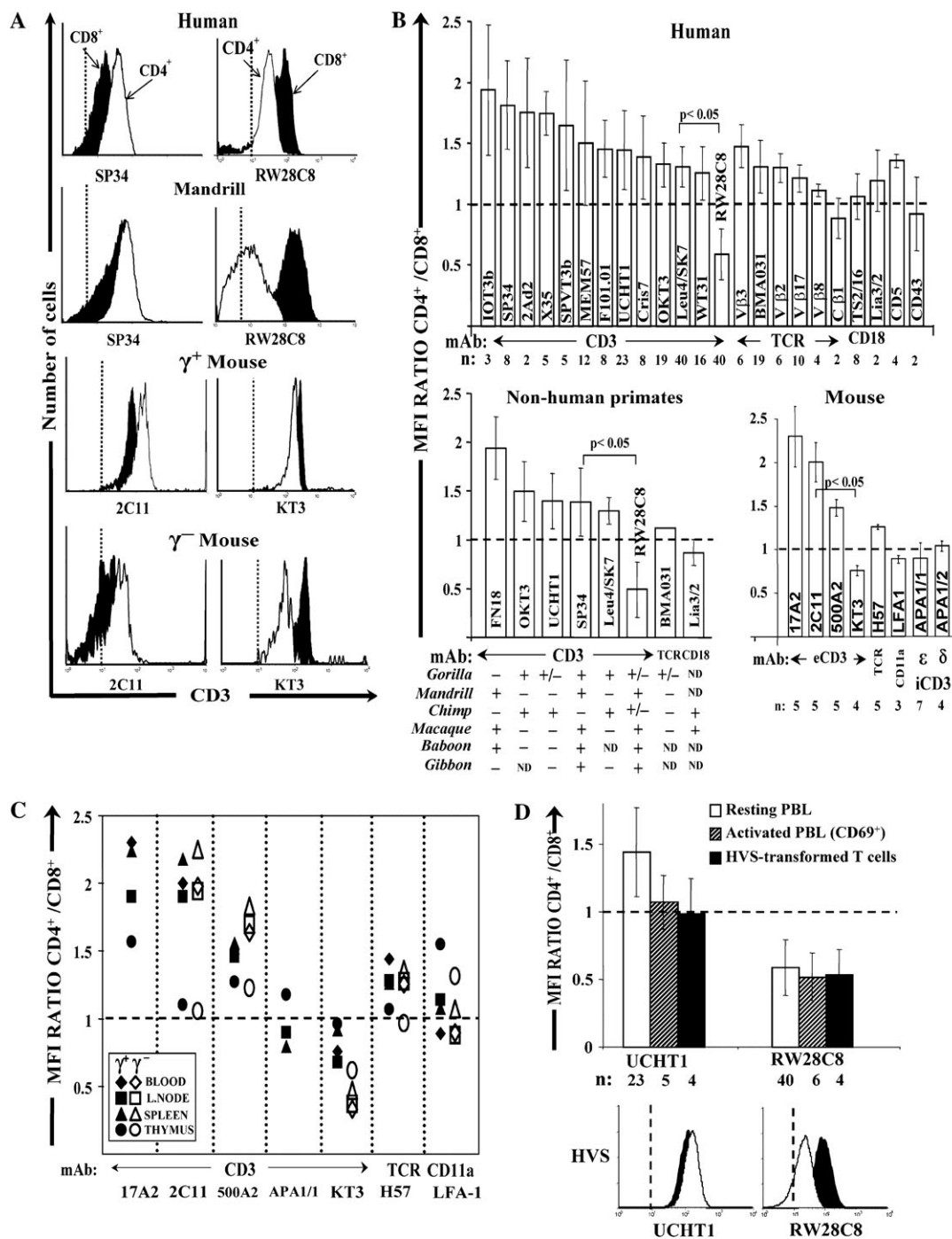
The  $5 \times 10^6$  sorted  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  lymphocytes or Jurkat T cells were allowed to swell for 10 min in 1 ml hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 42 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and protease inhibitors). The cells were then disrupted using a Dounce homogenizer and the membranes were pelleted in an ultracentrifuge TLA 100 (Beckman Instruments, Gagny, France) at 48 000 r.p.m. for 30 min. Membranes were lysed in 25  $\mu$ l blue native (BN) buffer (500 mM 6-aminohexanoic acid, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 20 mM bis-Tris, pH 7 and protease inhibitors) containing the appropriate detergent (0.3% Brij96 or 0.5% digitonin). The clarified membrane lysates were separated by BN-PAGE (4–9%) as described (3). Semi-dry transfer of the proteins to a polyvinylidene difluoride membrane was done. Immunoblots were developed with an anti- $\zeta$  antiserum. Ferritins in its 24mer (f1; 440 kD) and 48mer (f2; 880 kD) forms were included as molecular mass standards.

## Results

#### Differential antibody binding to the $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of primary $\text{CD4}^+$ and $\text{CD8}^+$ T lymphocytes is phylogenetically conserved

We reported previously that the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex borne by human primary  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T lymphocytes is not identical because certain mAbs, such as SP34 or UCHT1, bind the former better, whereas other mAb, such as RW28C8, bind the latter better (9). In order to extend these observations to other species, we studied six non-human primates and mice. The results are summarized in Fig. 1 in comparison to humans. First, not all human-specific CD3 mAb bound non-human primate T cells, but those which did (denoted by + and +/- under the graph in Fig. 1B) confirmed the findings above (Fig. 1A and B). Interestingly, in some cases  $\text{CD4}^+$ , but not  $\text{CD8}^+$ , T cells were bound very poorly by RW28C8 (Mandrill, for instance, Fig. 1A). Second, mouse T cells were scanned using an entirely different set of mAb (Fig. 1A–C). The result indicated that the mouse surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex from  $\text{CD4}^+$  T cells, as shown for primates, was bound better than that of  $\text{CD8}^+$  T cells by most (2C11, 17A2, 500A2), but not all (KT3) CD3-specific mAb. This was most likely due to extracellular differences, since differential binding was not apparent upon staining intracellular CD3 epitopes, such as those recognized by APA1/1 (iCD3 $\epsilon$ ) or APA1/2 (iCD3 $\delta$ , Fig. 1B and C). Thus, KT3 in mice mimics RW28C8, as it bound better to  $\text{CD8}^+$  than to  $\text{CD4}^+$  cells. This indicates that the antibody-binding





**Fig. 1.** Differential antibody binding to the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 of normal ( $\gamma^+$ ) or CD3 $\gamma$ -deficient ( $\gamma^-$ ) CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T lymphocytes in several mammalian species. (A) Representative reactivity patterns of selected mAb in CD4 $^+$  (open histograms) and CD8 $^+$  (filled histograms) PBMC. Profiles are shown as logarithm of relative fluorescence versus cell number. The vertical line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAb. (B) MFI ratios  $\pm$  SD of CD4 $^+$  relative to CD8 $^+$  peripheral blood T cells with the indicated mAb in  $n$  independent individuals. For non-human primates, the (similar) results of different species were pooled to simplify the figure. '+' means clear binding of the indicated CD3 mAb to CD4 $^+$  or CD8 $^+$  T cells as shown in (A) for Mandrill; '-' and '+/-' stand for no or weak binding to both T cell subsets, respectively; ND, not done; eCD3, extracellular CD3. MFI ratios were calculated only for + and +/- samples. Brown lemur T cells were omitted, as they did not show specific binding to the mAbs assayed. MFI ratios above or below 1 (indicated by the horizontal dotted line) reflect an increased or decreased mAb binding to CD4 $^+$  cells, respectively. Statistical significance (Student's  $t$ -test) is shown only for selected mAb. As invariant controls, CD18, CD5, CD43 or CD11a were evaluated, together with intracellular CD3 (iCD3; APA1/1 and APA1/2) in mouse samples (C) MFI ratios as in panel (B) are shown for several lymphoid tissues both in  $\gamma^+$  (filled symbols) and in  $\gamma^-$  (open symbols) mouse T cells. L.NODE, lymph node. 17A2 does not bind  $\gamma^-$  cells. APA1/1 was not tested in  $\gamma^-$  samples. (D) MFI ratios as in panel (B) are shown for the indicated mAb and activated T-lineage human cells, as compared with resting T cells. Representative reactivity patterns as in panel (A) are shown for *H. saimiri*-transformed T cells (HVS).

differences to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are conserved in evolution. The results were confirmed in all tested mouse lymphoid tissues, including early (thymus) and late (blood, lymph node, spleen) T cell differentiation stages and also in the absence of CD3 $\gamma$  (Fig. 1C) as reported in  $\gamma^-$  humans (9). The observed differences in KT3 binding between CD3 $\gamma^+$  and  $\gamma^-$  samples suggest that the KT3 epitope is more CD3 $\gamma$  dependent than other mAb, such as 17A2 or 2C11. From these experiments, we conclude that the antibody-binding differences observed in humans between the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are conserved in phylogeny, as well as along mouse T cell differentiation.

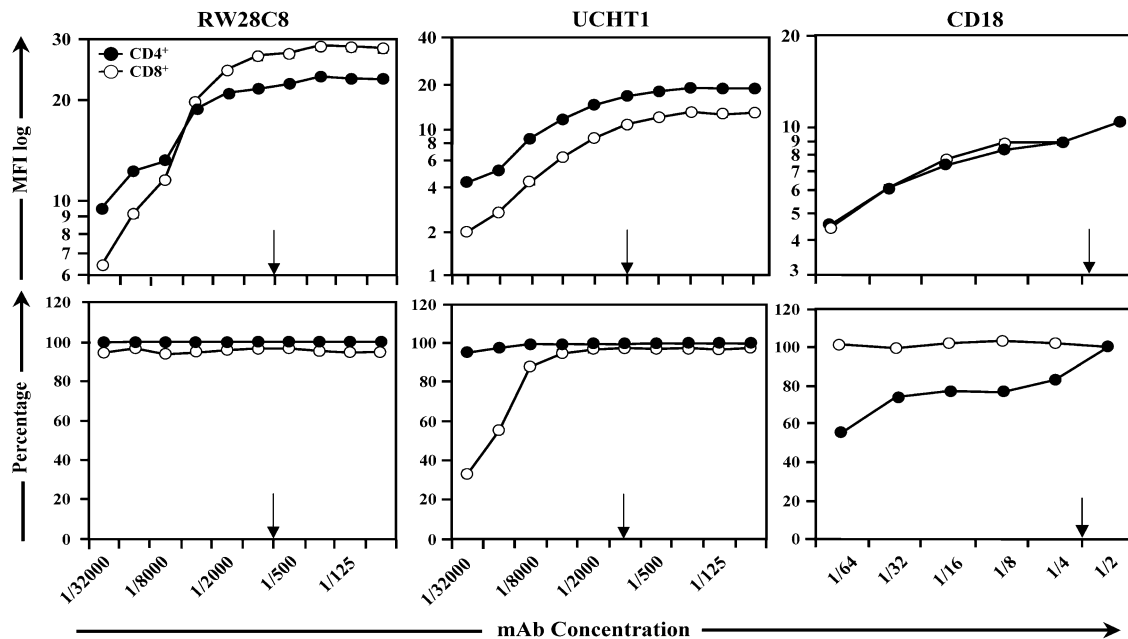
*Activation-independent differential binding of RW28C8 to human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lineage lymphocytes*

Antigen recognition causes profound surface changes in T lymphocytes (18) and in the TCR-CD3 complex (19). To determine whether the observed  $\alpha\beta$ TCR-CD3 antibody-binding differences were regulated by activation, we compared antibody reactivities in human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, either resting or recently activated (short-term CD69<sup>+</sup> PBMC blasts) or constitutively activated by *H. saimiri* transformation (20). Activation had an impact on  $\alpha\beta$ TCR-CD3 antibody binding as measured with UCHT1, but the changes did not affect recognition of the RW28C8 epitope, which remained more strongly expressed by CD8<sup>+</sup> T lymphocytes even after *H. saimiri* transformation (Fig. 1D). Specific interference by the CD4 molecule is unlikely, as binding of RW28C8 was enhanced even further in human CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> immature T cells (9).

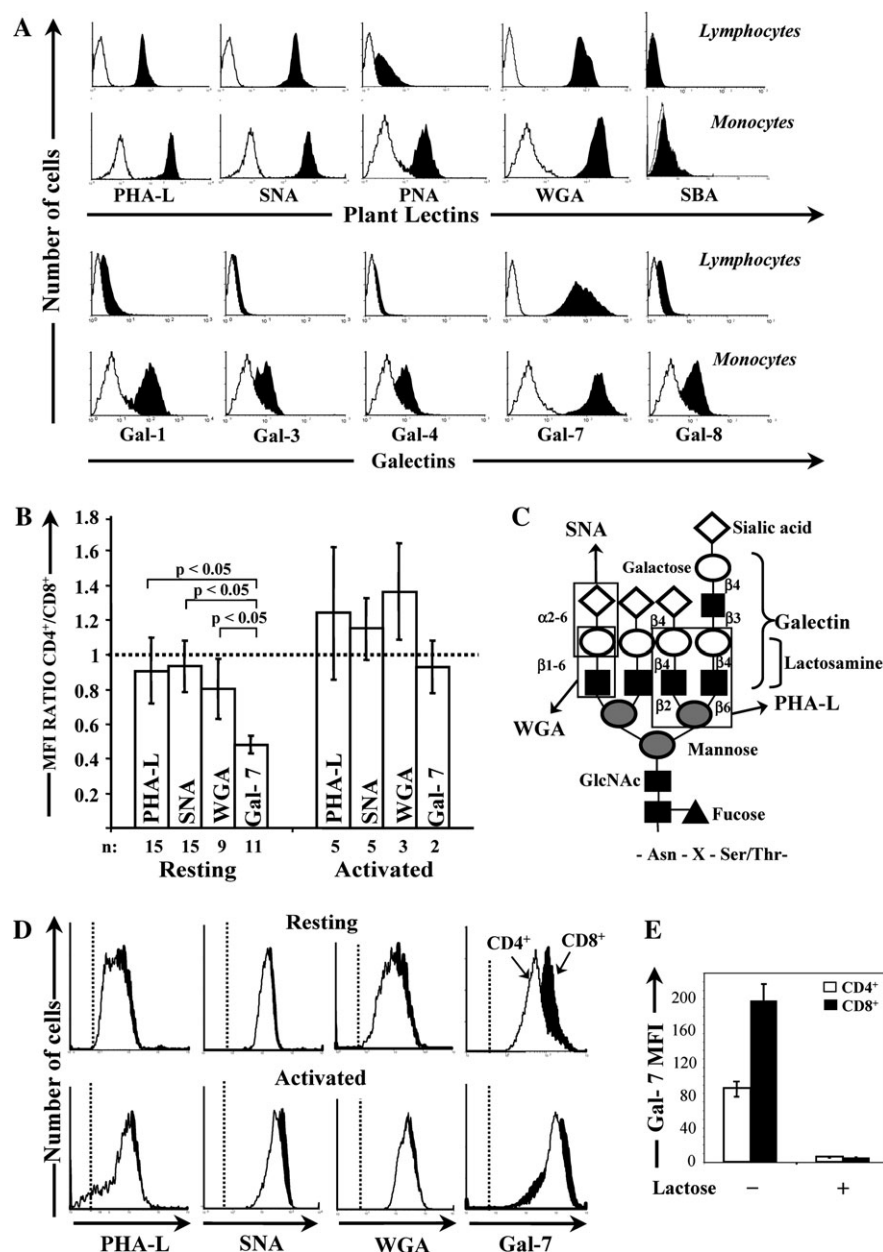
To further characterize RW28C8 binding to human CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, we performed comparative titrations (21) using UCHT1 and CD18 as controls. The results showed that, in contrast to both control mAb, which were diluted out with similar slopes from CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, RW28C8 binding dropped more rapidly from CD8<sup>+</sup> than from CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2). Therefore, while the epitopes recognized by UCHT1 may be quantitatively more common on CD4<sup>+</sup> than on CD8<sup>+</sup> T cells (or similar in numbers in the case of CD18), but qualitatively identical, RW28C8 binds to an activation-independent epitope which is different between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lineage cells.

*Differential cell surface glycosylation of human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes*

The observed lineage-associated  $\alpha\beta$ TCR-CD3 antibody-binding differences could be caused by developmentally acquired features that distinguish the two cell types, including their glycosylation machinery (22, 23). Lectins are carbohydrate-binding proteins derived from plants and animals that can be used for identification, purification and characterization of glycoconjugates (24). Human primary lymphocytes, both resting and activated, were incubated with a large panel of lectins. For the glycan recognition patterns of some of them, see Fig. 3(C). Three of five tested plant lectins and one of five tested human Gals bound resting human primary lymphocytes strongly (Fig. 3A, where binding to monocytes was used as a positive control). The four lymphocyte-binding lectins were next analyzed comparatively within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3B and D). All four lectins, but particularly Gal-7 ( $P < 0.05$  versus the other three), bound resting CD8<sup>+</sup>



**Fig. 2.**  $\alpha\beta$  T cell lineage-associated differential binding of RW28C8. Human PBMCs were incubated with serial dilutions of the indicated mAb and analyzed by flow cytometry within CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T cells. Binding avidity was estimated as MFI log (top). The percentage of bound cells (bottom) was monitored in parallel to exclude dilutions which could not stain all cells. Vertical arrows indicate the working dilution used for each mAb in other experiments to ensure saturation.



**Fig. 3.** Differential surface glycosylation of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> peripheral blood T lymphocytes. (A) Representative lectin binding to human fresh mononuclear leukocytes. The indicated fluorescence-conjugated lectins were incubated with PBMC and analyzed by flow cytometry after gating for lymphocytes or monocytes based on forward versus side scatter. Open histograms represent background fluorescence using an irrelevant lectin (IB4). (B) MFI ratios  $\pm$  SD of CD4<sup>+</sup> relative to CD8<sup>+</sup> T cells (either resting or activated) with the indicated lectins in *n* independent individuals. (C) N-linked glycan recognition patterns of several mammalian and plant lectins. Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; Man, mannose; Fuc, fucose. (D) Representative reactivity patterns in resting (top) and activated (bottom) CD4<sup>+</sup> (open histograms) and CD8<sup>bright</sup> (filled histograms) PBMC. The vertical line in each panel indicates the upper limit of background fluorescence using an irrelevant fluorescein-conjugated IB4 lectin or GST-FITC. (E) Lactose treatment blocked Gal-7 binding to human T lymphocytes.

T cells better than resting CD4<sup>+</sup> T cells, supporting the existence of differential glycosylation between them. Differential Gal-7 binding was dependent on carbohydrate recognition, since it was completely blocked by lactose in both cell types (Fig. 3E).

T cell activation has a profound impact on the patterns of cell surface glycosylation (25). Accordingly, activation increased lectin binding to lymphocytes (Fig. 3D), but again

differentially on each cell subset. In general, lectin binding was increased to a higher extent on CD4<sup>+</sup> cells than on CD8<sup>+</sup> T cells following activation, and this was particularly evident in the case of Gal-7 binding (Fig. 3B and D).

Taken together, these results are compatible with the existence of differential cell surface glycosylation patterns between human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which can be modified upon activation.

### Differential lectin competition with CD3 mAb binding to human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes

To establish if the observed lineage-associated cell surface glycosylation differences were involved in the generation of distinct  $\alpha\beta$ TCR-CD3 configurations in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, human PBMCs were incubated with increasing amounts of the four lymphocyte-binding lectins before staining with four representative CD3-specific mAb and analyzed within CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. The results are summarized in Fig. 4 and Table 1. The CD4- and CD8-specific mAbs were unaffected by most lectins (Fig. 4A and B, and data not shown), with the exception of WGA which competed with anti-CD4 binding (data not shown), and it was thus excluded from the analysis. Among the remaining 12 lectin/CD3 mAb combinations, all possible competition results were observed (Fig. 4A and C). In some cases, the lectin did not hinder binding of certain CD3 mAb (Gal-7/RW28C8, Fig. 4A, right). Thus, neither the percentage of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Fig. 4A, top right) nor CD3 MFI within CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4A, bottom right) was affected by the lectin. In other cases (Leu4), the percentage of CD3<sup>+</sup> cells was reduced to different extents in a lectin dose-dependent fashion (Fig. 4A, top), with SNA > PHA-L > Gal-7, as reflected by the indicated slopes. Among these cases, three different situations were observed (as reflected by the slopes shown in Fig. 4A, bottom): (i) CD3 binding was reduced similarly in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (SNA/Leu4, representative histograms in Fig. 4B), (ii) CD3 binding was more reduced in CD8<sup>+</sup> than in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (Gal-7/Leu4) and (iii) CD3 binding was more reduced in CD4<sup>+</sup> than in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (PHA-L/Leu4, representative histograms in Fig. 4B).

From these experiments, we conclude that lectin binding to human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes differentially competes with CD3 mAb recognition of these subsets, thus suggesting that differential glycosylation may be responsible for the observed lineage-associated  $\alpha\beta$ TCR-CD3 antibody-binding differences.

In order to prove directly that glycosylation hinders antibody binding to the  $\alpha\beta$ TCR-CD3, we incubated Jurkat T cells with swainsonine, an early inhibitor of N-glycosylation, and stained the cells with  $\alpha\beta$ TCR-CD3-specific mAb (BMA031, RW8C8 and OKT3). PHA-FITC binding was used as a probe for impaired N-glycosylation. The results indicated that, in sharp contrast with PHA, all tested mAbs, particularly BMA031, bound better the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 after swainsonine treatment (Fig. 4D). This indicates that the mAb-binding sites were covered in part by N-glycans.

### Native analysis of the multivalent TCR-CD3 complexes on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes

The differential binding of anti-CD3 mAbs to CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells could also be explained if the ratio of monovalent to multivalent TCR-CD3 varied between these cell types. To address this, we performed BN PAGE analysis of total membrane fractions from both cell types (Fig. 5). As seen previously (9), the TCR-CD3 complex extracted by the detergent digitonin is similar in size in both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Since digitonin disrupts the multivalent complexes,

only the monovalent ones with the  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$  stoichiometry remain (2). Here, additionally, we also extracted the TCR-CD3 from membrane fractions using the detergent Brij96. This detergent keeps both multivalent and monovalent TCR-CD3 complexes intact (2). The monovalent complex extracted with Brij96 appears as a broader band than the one seen with digitonin as reported (2). This was probably due to different detergent micelles. The large molecular weight complexes are the multivalent TCR-CD3s. Previously, we have shown that these large complexes are not an artifact due to insufficient membrane solubilization or aggregation during the electrophoresis (2). Indeed, they correspond to the multivalent complexes detected by electron microscopy (2) and fluorescence resonance energy transfer measurements (26) on intact cells. The amount of multivalent TCR-CD3 present on CD4<sup>+</sup> cells is similar to that seen in CD8<sup>+</sup> cells (Fig. 5). This is comparable to the amount of multimers seen in the human T cell line Jurkat. In conclusion, the ratio of monovalent to multivalent TCR-CD3 was the same in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> peripheral T cells, thus ruling it out as the cause of differential antibody binding.

## Discussion

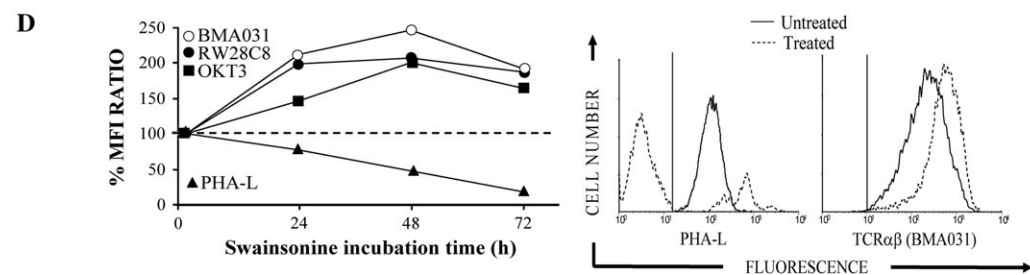
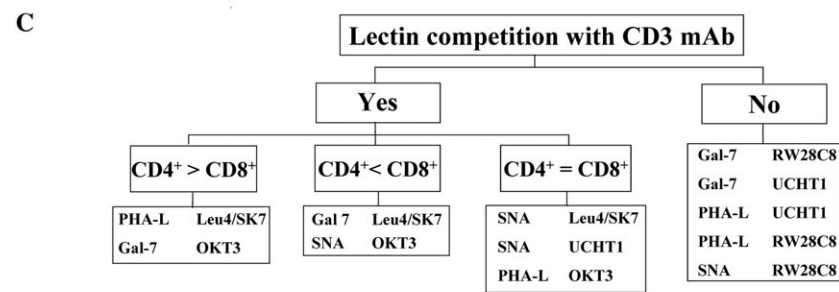
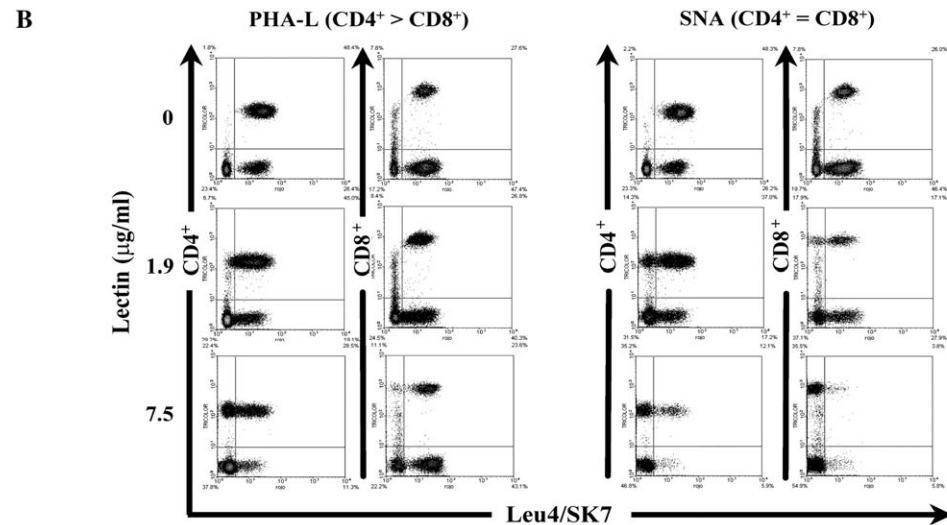
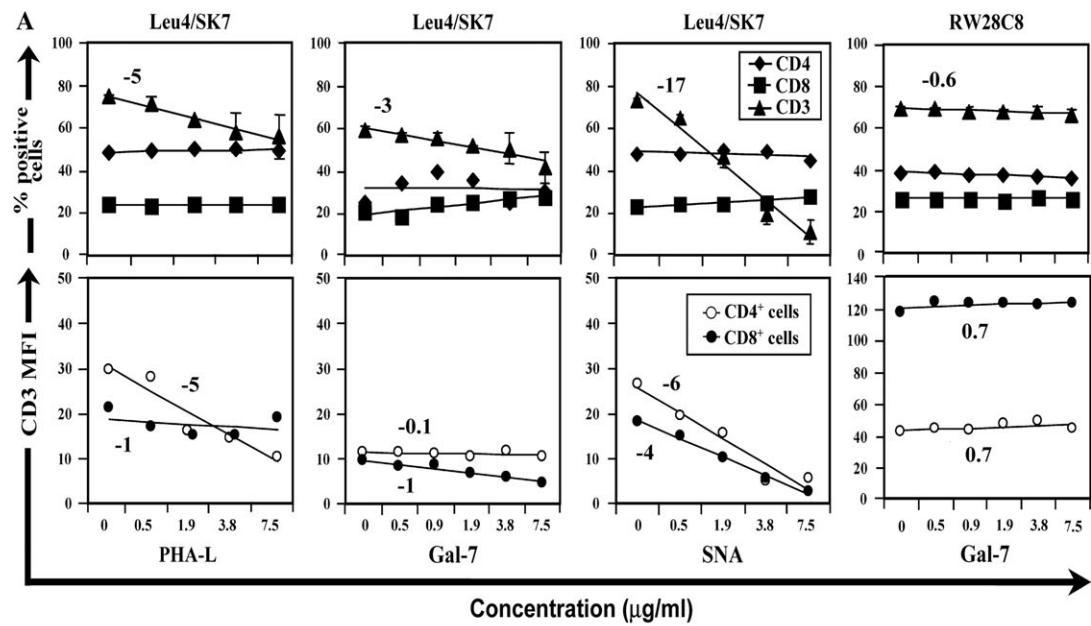
### Phylogenetically conserved differences between the surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes

We have used two unrelated sets of TCR-CD3-specific mAb to probe comparatively the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from seven different mammalian species. Our results demonstrate that the TCR-CD3 antibody-binding differences reported initially for human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (8, 9) are conserved in mammal evolution and thus of potential adaptive value. Therefore, CD8<sup>+</sup> T cells appear to be distinguished from their CD4<sup>+</sup> counterparts not only by the expression of the specific co-receptor but also based on a distinct configuration of their surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complexes, which is phylogenetically conserved and independent from T cell receptor specificity and activation status.

### Differential glycosylation of human T cell subsets and of their surface $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex

Our lectin binding results indicate that the surface of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells is differentially decorated by lectin ligands as proposed in Fig. 6. Indeed, 4 of the 12 tested lectins, particularly Gal-7, bound to CD8<sup>+</sup> better than to CD4<sup>+</sup> resting T cells (Fig. 3B and C). Differential effects of glycosylation on specific T cell lineages have been reported previously. For instance, sialyltransferase ST3 Gal-I deficient mice lacked CD8<sup>+</sup>, but not CD4<sup>+</sup>, T lymphocytes (27). Conversely, mice lacking the heavily glycosylated CD83 receptor showed impaired CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T cell development (28). More recently, primary mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells have been shown to have different profiles of N-linked glycans (25).

As the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 is a complex ensemble of surface glycoproteins, it is likely affected by the general differences in the pattern of glycosylation between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.



**Table 1.** Differential lectin competition with CD3 mAb binding to human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells<sup>a</sup>

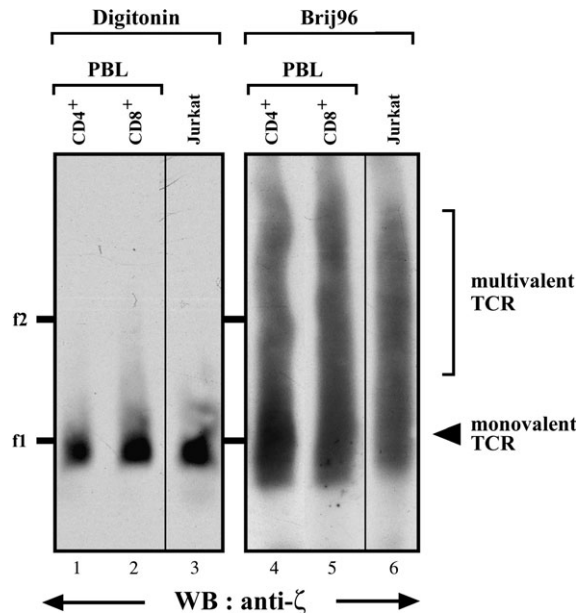
mAb	Binding parameters	Lectin pre-incubation					
		PHA-L		Gal-7		SNA	
		<i>m</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>m</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>m</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
Leu4/SK7	%CD3 <sup>+</sup> cells	<b>-5</b>	<b>0.96</b>	<b>-3</b>	<b>0.89</b>	<b>-17</b>	<b>0.97</b>
	CD3 MFI in CD4 <sup>+</sup> cells	<b>-5</b>	<b>0.92</b>	-0.1	0.13	<b>-6</b>	<b>0.93</b>
	CD3 MFI in CD8 <sup>+</sup> cells	-1	0.14	<b>-1</b>	<b>0.93</b>	<b>-4</b>	<b>0.99</b>
UCHT1	%CD3 <sup>+</sup> cells	-2	0.47	-1	0.44	<b>-10</b>	<b>0.95</b>
	CD3 MFI in CD4 <sup>+</sup> cells	-0.4	0.02	-0.3	0.16	<b>-3</b>	<b>0.85</b>
	CD3 MFI in CD8 <sup>+</sup> cells	-0.8	0.27	-0.1	0.00	<b>-3</b>	<b>0.84</b>
OKT3	%CD3 <sup>+</sup> cells	<b>-2</b>	<b>0.72</b>	<b>-3</b>	<b>0.96</b>	<b>-2</b>	<b>0.88</b>
	CD3 MFI in CD4 <sup>+</sup> cells	-0.3	0.19	<b>-2</b>	<b>0.71</b>	-0.3	0.04
	CD3 MFI in CD8 <sup>+</sup> cells	-0.1	0.01	-0.3	0.27	<b>-1</b>	<b>0.79</b>
RW28C8	%CD3 <sup>+</sup> cells	<b>-1</b>	<b>0.76</b>	<b>-0.6</b>	<b>0.77</b>	<b>-1.4</b>	<b>0.76</b>
	CD3 MFI in CD4 <sup>+</sup> cells	-2	0.34	0.7	0.26	-3	0.59
	CD3 MFI in CD8 <sup>+</sup> cells	2	0.52	0.7	0.28	1	0.23

<sup>a</sup>Data indicate slope (*m*) and linear correlation (*r*<sup>2</sup>) for CD3 mAb binding (% positive cells and MFI) after lectin pre-incubation as depicted in Fig. 4(A). Slopes closer to 0 reflect weak or no competition of lectins with mAb. Lower negative slopes reflect strong competition with mAb. Slopes with strong linear correlation (*r* < -0.84, *r*<sup>2</sup> > 0.7) are highlighted in bold face. See Fig. 4(B) for a summary of results and Fig. 4(A and C) for representative results and experiments.

Several pieces of evidence provide support for this contention. First, we have shown that there is differential lectin competition with CD3 mAb binding to human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 4 and Table 1). Second, our immunoprecipitation experiments revealed clear biochemical differences associated to TCR (but not CD3) chains between native, but not N-glycosylase-treated, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell samples (9). These differences extend to the CD3 $\delta$  subunit in T cells from CD3 $\gamma$ -deficient humans (8). Third, surface desialylation by treatment with *N*-acetyl neuraminidase increased RW28C8 binding to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, but more prominently in the former, so that the gross binding of the antibody was then similar in both T cell lineages (9). Thus, the epitope recognized by RW28C8 appeared to be masked by sialic acid residues, particularly in CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 4D and 6). This is reminiscent of the binding of the anti-CD3 antibody WT31 to  $\gamma\delta$  T cells, where the originally poor binding is markedly improved upon neuraminidase treatment (see below). Fourth, antibodies against intracellular CD3 $\epsilon$  or CD3 $\delta$  epitopes bind CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells sim-

ilarly (Fig. 1B and C). We believe that TCR rather than CD3 glycosylation is responsible for the antibody-binding differences (Fig. 6). Briefly, the human  $\alpha\beta$ TCR-CD3 has four potential N-glycosylation sites on TCR $\alpha$  and two each on TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$  and CD3 $\delta$ , whereas the mouse  $\alpha\beta$ TCR-CD3 has 3, 4, 1 and 3, respectively. However, recent structural data (29) revealed an oblique, side-on nature of OKT3 binding to the top of human CD3 $\epsilon$ , in a region dominated by a linear stretch of sequence on the F-G loop. Thus, it appears rather unlikely that glycans on CD3 $\delta$  or CD3 $\gamma$ , which in fact point away from the dimer interface, could interfere with the binding of OKT3 or other overlapping anti-CD3 mAb, i.e. UCHT1. In fact, UCHT1 can immunoprecipitate both TCR-CD3 $\epsilon\delta$  and TCR-CD3 $\epsilon\gamma$  hemicomplexes (30), indicating that its epitope is probably exposed on both CD3 $\epsilon$  chains in a complete  $\alpha\beta$ TCR-CD3 ensemble and that UCHT1 binding is not affected by the sugars associated to CD3 $\gamma$  or CD3 $\delta$ . Further, eliminating individually the N-glycosylation sites of human CD3 $\gamma$  (31) did not affect the binding of UCHT1 to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex. Yet, simultaneously

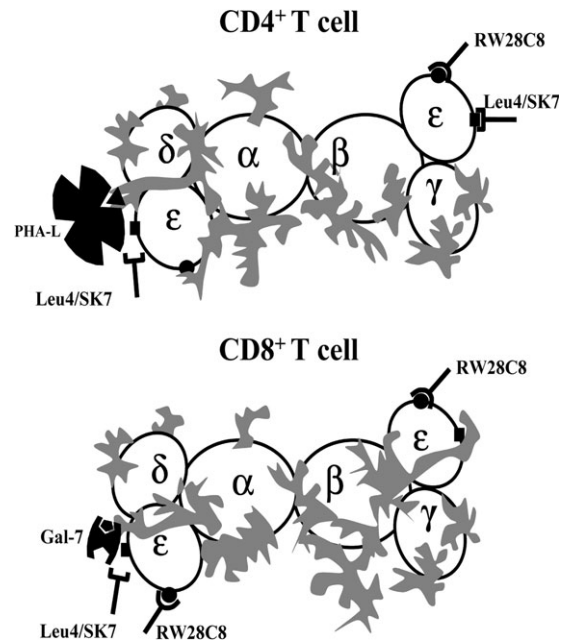
**Fig. 4.** Differential lectin competition with CD3 mAb binding to human primary CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Human PBMCs were incubated with increasing amounts of the indicated lectins, stained with CD3, CD4 (clone 13B8.2) and CD8 (clone B9.11) mAbs and analyzed by flow cytometry. (A) Percentage positive cells for selected mAb (top) and CD3 MFI for gated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (bottom) are plotted against lectin concentration to scan for T cell lineage-associated differential competition. The percentage of cells positive for CD4 or CD8 (top) serves as an internal control, as it was not affected in any of the samples. CD3 mAb % and MFI-binding slopes (*m* in Table 1) are indicated. The plots illustrate the four categories in panel (C). Slopes closer to 0 (such as in Gal-7 versus RW28C8) reflect weak or no competition of lectins with mAb. Lower negative slopes (like SNA or PHA-L versus Leu4/SK7) reflect strong competition with mAb, which is however different in CD4<sup>+</sup> as compared with CD8<sup>+</sup> cells in one case (PHA-L versus Leu4/SK7). (B) Representative histograms to illustrate that PHA-L competes Leu4/SK7 binding more on CD4<sup>+</sup> than in CD8<sup>+</sup> T cells, whereas SNA (and Gal-7, data not shown) do not compete differentially. For a full account of results, see Table 1. (C) Three lectins and four CD3 mAbs were tested (12 combinations, Table 1) and each paired lectin/CD3 mAb is listed under one of the four possible competition results: no competition, similar competition in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup> = CD8<sup>+</sup>), higher competition in CD4<sup>+</sup> than in CD8<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup> > CD8<sup>+</sup>) or lower competition in CD4<sup>+</sup> than in CD8<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup> < CD8<sup>+</sup>). (D) N-glycosylation reduction with a glycosidase inhibitor increased  $\alpha\beta$ TCR-CD3 mAb binding to human T cells. Jurkat T cells were incubated with swainsonine for up to 72 h and stained with labeled PHA (to monitor the efficiency of swainsonine treatment) or with several mAb. The results are expressed as % MFI ratio of treated versus untreated cells (left). Selected histograms (right) illustrate lowest (PHA) and highest (BMA031) binding of treated (dotted line) as compared with untreated (solid line) cells.



**Fig. 5.** Native analyses of the TCR-CD3 expressed on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Membrane fractions were prepared from sorted, non-stimulated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> human PBMCs and the human  $\alpha\beta$  T cell line Jurkat. The membranes were lysed in either digitonin (lanes 1–3) or Brij96 (lanes 4–6) and separated by BN PAGE. Immunoblotting was performed with an anti- $\zeta$  serum to detect only fully assembled TCR-CD3 complexes. The position of monovalent and multivalent receptors is shown to the right. The marker protein is ferritin in its 24mer (f1) and 48mer (f2) forms.

disrupting the two sites decreased UCHT1 binding, but in this case, as a result of impaired  $\alpha\beta$ TCR-CD3 structural stability and surface expression.

That glycosylation influences the binding of CD3-specific mAb is not without precedent. WT31, which binds much better  $\alpha\beta$  than  $\gamma\delta$  TCR-CD3, strongly binds the latter after desialylation (32). Activation of mouse  $\gamma\delta$  T cells results in differential glycosylation of the CD3 $\gamma$  subunit which correlated with impaired binding of the anti-CD3 $\gamma$  mAb H25 (19). Lastly, Mgat5<sup>-/-</sup> mouse T lymphocytes lacking Mgat5 N-glycan products, and thus PHA ligands, are bound better by the anti-CD3 mAb 2C11 (33), suggesting that N-glycans in part hide 2C11-binding sites. Similarly, we have shown that swainsonine-treated human T lymphocytes partially lacking N-glycan products, and thus PHA ligands, were bound better by several anti-TCR-CD3 mAb (Fig. 4D), again suggesting that N-glycans in part hide their binding sites, as proposed in Fig. 6. The buried surface area at the OKT3/CD3 $\epsilon\gamma$  interface is atypically small (29), which may reflect the small target exposed by CD3 $\epsilon$  within the TCR-CD3 complex. This structural feature could explain the finding that many anti-CD3 mAb recognize the same epitope as OKT3 (or an overlapping one). It would also explain that small changes in the vicinity of the antibody-binding site (as those generated by differential glycosylation) could have a marked impact on antibody binding, as the one we described here that differentiates CD4<sup>+</sup> from CD8<sup>+</sup> T cells. A thorough comparative analysis of N- and O-glycan content and glycosyl-transferase and glycosidases in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells is



**Fig. 6.** Model accounting for the differences between the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. TCR and CD3 chains (greek letters) as well as their stoichiometry would be identical in the two cell types. In contrast, the amount and diversity of glycans (in gray) may vary (most likely in TCR chains, as shown), so that certain mAb epitopes (RW28C8 filled circles, Leu4/SK7 filled squares) would be partially hidden in one or the other cell type, hindering mAb access in a CD3 $\gamma$ -independent fashion, as shown in Fig. 1 for several mammalian species. In addition, the differential distribution of lectin binding sites (PHA-L filled triangle, Gal-7 filled pentagon) near certain mAb epitopes (Leu4/SK7 in this very simplified diagram) would account for their cell lineage-specific competition with mAb binding, as shown in Fig. 4.

thus warranted. One such study has shown recently discordant expression of several glycosyl transferases between the two main T cell lineages in mice (25).

#### Clinical and diagnostic implications

The TCR-CD3 antibody-binding differences could be of relevance to T cell pathophysiology and may be exploited in the clinical setting. For instance, antibodies such as RW28C8 which bind with more avidity CD8<sup>+</sup> than CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 1) could be useful to modulate the numbers and/or function of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in transplantation and autoimmunity (34, 35). Disruption of N-glycosylation by Mgat5 ablation has been shown to lower T lymphocyte activation thresholds and cause autoimmunity (33). Similarly, the differential glycosylation of CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells could cause differential activation thresholds and/or mechanisms. Indeed, it has been shown recently that TCR-CD3 and CD4 are kept outside lipid rafts by a molecular Gal/N-glycan lattice that regulates activation thresholds (36), and developmentally regulated variation in CD8 sialylation may contribute to the developmental tuning of T cell sensitivity (37).

From the diagnostic standpoint, the results beg caution about interpretation of CD3 expression and T cell numbers when certain antibodies are used, particularly in human congenital disorders of glycosylation (38).

### Equal ratio of mono- versus multivalent TCR-CD3 in human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells

The size of the monovalent TCR-CD3, as obtained by lysis in digitonin, was identical in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> resting T cells. This demonstrates that the stoichiometry is the same in both lineages, namely  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$  (2, 9, Fig. 6). The assembly of the TCR-CD3 takes place in the endoplasmic reticulum before the enzymes of the Golgi apparatus confer differential glycosylation. Therefore, folding and assembly occur under similar conditions, leading to the same stoichiometry. Lastly, we show that the TCR-CD3 of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> co-exist in monovalent and multivalent complexes. Since both cell types show similar amounts of multimerized receptor complexes, we can conclude that the presence of multivalent complexes does not contribute to the differential mAb binding seen here. Earlier, we proposed that specific protein-protein interactions are responsible for the formation of the multivalent TCR-CD3 (2). Since variations in glycosylation of the TCR-CD3 do not seem to affect the ability of the complex to form multimers, the carbohydrate groups do not play a role in the generation of the multivalent TCR-CD3.

In conclusion, we have described a phylogenetically conserved trait in the  $\alpha\beta$  TCR distinguishing CD4<sup>+</sup> from CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which is likely emerging from the distinct patterns of glycoforms decorating the surface of these T cell subsets. Yet, the contribution of other factors, i.e. lineage-specific lipid raft distribution (9), cannot be presently ruled out. The challenge now is to understand how the distinct glycosylation status of the  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex affects receptor signaling, gene expression and function of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Complex N-glycans and their degree of branching have been reported recently to regulate T lymphocyte proliferation and differentiation (39). Therefore, lineage-specific glycosylation differences may have a major impact on CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cell differentiation and function (29, 30). The design of therapeutic strategies based on these findings deserves further investigation.

### Funding

Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2002-1431, BMC2002-3247); Ministerio de Educación (BFU2005-01738/BMC, SAF 2005-362); Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (GR/SAL/570/2004); Dirección General de Universidades e Investigación (CAM); Universidad Complutense de Madrid (Ref. 920631); Fundación Mutua Madrileña and Deutsche Forschungsgemeinschaft through the Emmy Noether program and the SFB620 to J.R.R., P.B., E.F.-M. and W.W.A.S.; Universidad de Los Andes (Venezuela), CAM and the Ramón y Cajal Program (Ministerio de Educación) to N.E.R., J.R. and E.F.-M.

### Acknowledgements

We greatly appreciate the generous supply of venous blood samples from non-human primates by E. Gómez and E. Martínez (Zoo-Aquarium Madrid, Spain). We also thank the Fundación Jiménez Díaz Blood Bank and the Blood Transfusion Service (Madrid) for buffy coats; the mAb and lectin donors cited in Experimental Procedures; L. Pérez and C. Ramírez (Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain) for technical help with cell cultures.

### Abbreviations

BN	blue native
CBMSO	centro de biología molecular severo ochoa
CSIC	consejo superior de investigaciones científicas
Gal	galectin
GST	glutathione-S-transferase
MFI	mean fluorescence intensity
TCR	T cell antigen receptor

### References

- Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P. and Schamel, W. W. 2003. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol. Rev.* 191:38.
- Schamel, W. W., Arechaga, I., Risueno, R. M. *et al.* 2005. Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J. Exp. Med.* 202:493.
- Hellwig, S., Schamel, W. W., Pflugfelder, U., Gerlich, B. and Weltzien, H. U. 2005. Differences in pairing and cluster formation of T cell receptor alpha- and beta-chains in T cell clones and fusion hybridomas. *Immunobiology* 210:685.
- Thibault, G. and Bardos, P. 1995. Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J. Immunol.* 154:3814.
- Timon, M., Arnaiz-Villena, A., Rodriguez-Gallego, C., Perez-Aciego, P., Pacheco, A. and Regueiro, J. R. 1993. Selective disbalances of peripheral blood T lymphocyte subsets in human CD3 gamma deficiency. *Eur. J. Immunol.* 23:1440.
- Haks, M. C., Krimpenfort, P., Borst, J. and Kruisbeek, A. M. 1998. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. *EMBO J.* 17:1871.
- Kappes, D. J., Alarcon, B. and Regueiro, J. R. 1995. T lymphocyte receptor deficiencies. *Curr. Opin. Immunol.* 7:441.
- Zapata, D. A., Pacheco-Castro, A., Torres, P. S. *et al.* 1999. Conformational and biochemical differences in the TCR-CD3 complex of CD8(+) versus CD4(+) mature lymphocytes revealed in the absence of CD3gamma. *J. Biol. Chem.* 274:35119.
- Zapata, D. A., Schamel, W. W., Torres, P. S. *et al.* 2004. Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor-CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 279:24485.
- Lim, L. C., Fiordalisi, M. N., Mantell, J. L., Schmitz, J. L. and Folds, J. D. 1998. A whole-blood assay for qualitative and semiquantitative measurements of CD69 surface expression on CD4 and CD8 T lymphocytes using flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:392.
- Pacheco-Castro, A., Alvarez-Zapata, D., Serrano-Torres, P. and Regueiro, J. R. 1998. Signaling through a CD3 gamma-deficient TCR/CD3 complex in immortalized mature CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 161:3152.
- Andersen, H., Jensen, O. N., Moiseeva, E. P. and Eriksen, E. F. 2003. A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 18:195.
- Magnaldo, T., Fowles, D. and Darmon, M. 1998. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 63:159.
- Nishi, N., Shoji, H., Seki, M. *et al.* 2003. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. *Glycobiology* 13:755.
- Chabot, S., Kashio, Y., Seki, M. *et al.* 2002. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology* 12:111.
- Huflejt, M. E., Jordan, E. T., Gitt, M. A., Barondes, S. H. and Leffler, H. 1997. Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 272:14294.
- Risueno, R. M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B. 2005. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 106:601.



## 12 Conserved lineage-associated variation in $\alpha\beta$ TCR-CD3

- 18 Daniels, M. A., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C. 2002. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* 3:903.
- 19 Hayes, S. M., Laky, K., El Khoury, D., Kappes, D. J., Fowlkes, B. J. and Love, P. E. 2002. Activation-induced modification in the CD3 complex of the gammadelta T cell receptor. *J. Exp. Med.* 196:1355.
- 20 Meinel, E., Hohlfield, R., Wekerle, H. and Fleckenstein, B. 1995. Immortalization of human T cells by *Herpesvirus saimiri*. *Immunol. Today* 16:55.
- 21 Geuijen, C. A., Clijsters-van der Horst, M., Cox, F. *et al.* 2005. Affinity ranking of antibodies using flow cytometry: application in antibody phage display-based target discovery. *J. Immunol. Methods* 302:68.
- 22 Daniels, M. A., Devine, L., Miller, J. D. *et al.* 2001. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity* 15:1051.
- 23 Moody, A. M., Chui, D., Reche, P. A., Priatel, J. J., Marth, J. D. and Reinherz, E. L. 2001. Developmentally regulated glycosylation of the CD8alphabeta coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell* 107:501.
- 24 Sharon, N. and Lis, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246:227.
- 25 Comelli, E. M., Sutton-Smith, M., Yan, Q. *et al.* 2006. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* 177:2431.
- 26 Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A. *et al.* 1999. Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:1547.
- 27 Priatel, J. J., Chui, D., Hiraoka, N. *et al.* 2000. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 12:273.
- 28 Fujimoto, Y., Tu, L., Miller, A. S. *et al.* 2002. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* 108:755.
- 29 Kjer-Nielsen, L., Dunstone, M. A., Kostenko, L. *et al.* 2004. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:7675.
- 30 Arnett, K. L., Harrison, S. C. and Wiley, D. C. 2004. Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHT1 single-chain antibody fragment. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 101:16268.
- 31 Dietrich, J., Neisig, A., Hou, X., Wegener, A. M., Gajhede, M. and Geisler, C. 1996. Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *J. Cell Biol.* 132:299.
- 32 van de Griend, R. J., Borst, J., Tax, W. J. and Bolhuis, R. L. 1988. Functional reactivity of WT31 monoclonal antibody with T cell receptor-gamma expressing CD3 + 4-8- T cells. *J. Immunol.* 140:1107.
- 33 Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. and Dennis, J. W. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mga5 N-glycosylation. *Nature* 409:733.
- 34 van de Wetering, J., van der Mast, B. J., de Kuiper, P. *et al.* 2005. Reduction of immunosuppressive load in renal transplant recipients with a low donor-specific cytotoxic T-lymphocyte precursor frequency is safe. *Transplant. Proc.* 37:779.
- 35 Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. and Herold, K. C. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115:2904.
- 36 Chen, I. J., Chen, H. L. and Demetriou, M. 2007. Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *J. Biol. Chem.* 282:35361.
- 37 Gil, D., Schrum, A. G., Daniels, M. A. and Palmer, E. 2008. A role for CD8 in the developmental tuning of antigen recognition and CD3 conformational change. *J. Immunol.* 180:3900.
- 38 Freeze, H. H. 2007. Congenital disorders of glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. *Curr. Mol. Med.* 7:389.
- 39 Lau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A. *et al.* 2007. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* 129:123.

# **CD3G transmembrane mutation p.V131F as a putative immunodeficiency risk factor.**

Recio MJ<sup>1,2</sup>, Busto EM<sup>1,2</sup>, Reiné J<sup>1,2</sup>, Pérez-Flores V<sup>1</sup>; Crespo AC<sup>1</sup>, Allende LM<sup>3</sup>, van Montfrans JM<sup>4</sup>, Lefranc G<sup>5-6</sup>, Moreno-Pelayo MA<sup>7</sup>, Regueiro JR<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Immunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Pediatric Immunology and Infectious Diseases, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Netherlands

<sup>5</sup>CNRS UPR 1142, Montpellier, France

<sup>6</sup>Université Montpellier 2, Montpellier, France

<sup>7</sup>Hospital Ramón y Cajal, IRYCIS and CIBERER, Madrid, Spain

**Address correspondence to: Dr. José R. Regueiro, Immunología, Facultad de Medicina,**

**Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34913941642. Fax:**

**+34913941641. E-mail address: [regueiro@med.ucm.es](mailto:regueiro@med.ucm.es)**

**Key words:** T Cells, T cell receptor, Immunodeficiencies,

## ABSTRACT

The p.V131F mutation is located at the transmembrane region of the CD3 $\gamma$  protein within a highly conserved region and is crucial for the assembly of the TCR/CD3 complex. It has been identified in three immunodeficient patients from two unrelated families in which no other pathogenic mutations were found.

**Cases report:** Patients 1 and 2.- The first proband (patient 1) was the first child of consanguineous parents and homozygous for this mutation. He displayed SCID symptoms with normal levels of T and B cells, low serum IgG levels, normal proliferation response to phytohemagglutinin (PHA) but decreased to antigens and OKT3 (antibody to CD3). He died at age 7 years. His sister (patient 2) was heterozygous for this mutation and showed the same clinical symptoms and lab findings. She died at age 12 years. Both parents are healthy and carry the p.V131F mutation in heterozygous state. Patient 3.- A two-years old boy, heterozygous for this mutation, showed a severe episode of HHV-6 pneumonia without SCID symptoms. The immunological test showed: mild TCD4 lymphopenia, low serum immunoglobulins levels and normal response to mitogens (PHA) and decreased to antigens. There is no consanguinity or familial history of immunodeficiency.

**Results and conclusions:** Immunophenotype: peripheral blood T cells from both heterozygous patients showed a slight decreased expression of CD3 as detected by flow cytometry assays. CD3 expression was normal in all the healthy controls (homozygous, heterozygous) examined. Population study: the results obtained revealed that in the cohort of controls examined the p.V131F mutation was in heterozygous and homozygous state in 22% and 6% of individuals, respectively. The data presented here show that the p.V131F mutation is frequent in healthy population. Therefore, although it cannot be pathogenic by itself, it cannot be excluded as a risk factor for immunodeficiency.

**c.657CT polymorphism in exon 3 of CIAS1 gene is not  
associated with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory  
Disease (NOMID)**

Reiné J<sup>1,2</sup>, Couso J<sup>1</sup>; Gurbindo D<sup>3</sup>, Regueiro JR<sup>1,2</sup> and Recio MJ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Immunología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

**Address correspondence to: Dr. María José Recio, Immunología, Facultad de Medicina,  
Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel: +34913941630. Fax:**

**+34913941641. E-mail address: [majoreho@med.ucm.es](mailto:majoreho@med.ucm.es)**

## ABSTRACT

The Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID) is mainly characterized by skin rashes and inflammation that occur in most cases during the first months of life. Most of the mutations identified are in exon 3 of CIAS1 gene, which encodes the central domain of cryopyrin, involved in the regulation of proinflammatory pathways, and NK-k caspase-1/IL-1 $\beta$ . Deregulation of these pathways leads to systemic inflammatory disorder presenting most of the diagnosed patients.

We report a case of a patient with 14 years of age diagnosed with a possible NOMID, with a history of maculopapular lesions papular lesions and erythematous, inflammatory signs interphalangeal joints and numerous episodes of polyarthrititis of large joints (knees, hands and feet) during the first months of life. Analytically since the beginning of clinical hypochromic hemolytic anemia presented, leukocytosis and thrombocytosis with elevated acute phase reactants. Treatment with NSAIDs and corticosteroids has not been successful.

The molecular analysis performed in the patient, using specific primers of exon 3 of CIAS1 gene reveals a heterozygous change of C > T at position 657 (c.657C > T), which does not result in amino acid change, it is not present in the mother or the other controls were studied. In addition, the analysis of lymphocyte subpopulations in patients, using monoclonal antibodies, shows a slight CD8<sup>+</sup> T lymphopenia. Our results suggest that although c.657C>T polymorphism found in exon of CIAS1 gene is not responsible for this condition, we cannot exclude any other mutations in exons not studied.



## JESÚS REINÉ GUTIÉRREZ

Dpto. Inmunología, Facultad de Medicina

TL: (+34) 91.394.1640 - 677281944

Universidad Complutense de Madrid

FX: (+34) 91.394.1641

Avda. Complutense S/N, Pabellón 5, Planta IV

EM: jreine@med.ucm.es/jreine@cytognos.com

Madrid 28040, ESPAÑA

---

### Inmunología Celular y Molecular

---

#### PERFIL

- **Posición actual:** Investigador en el departamento de I+D+i de la empresa biotecnológica Cytognos S.L. (Salamanca).
- **Publicaciones:** 5 + publicaciones en revistas nacionales e internacionales (+ 4 en preparación)
- **Experiencia profesional en laboratorio:** Western-blot, Citometría de flujo, Cultivos celulares, transfección, siRNA, ELISA, Inmunofluorescencia, Inmunoprecipitaciones, etc.
- **Idiomas:** English (Upper -Intermediate), Francés (Alto) y Español (Lengua materna)
- **Áreas de investigación de interés:** Inmunología de las células T y B, Señalización celular e inmunodeficiencias.

#### FORMACIÓN ACADÉMICA

**2005-2011 Defensa Tesis Doctoral.** Universidad Complutense de Madrid. Tesis: Estructura y función del complejo TCR/CD3 en las deficiencias congénitas y adquiridas (*Knock-Down*) de CD3.

**2003-2004 Certificado de aptitud pedagógica (CAP).** Universidad de Granada.

**2002-2004 Diploma de Estudios Avanzados (DEA).** Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Homologado por la Universidad Complutense de Madrid. Máxima calificación: Sobresaliente

**2002-2004 5º Curso de la Licenciatura de Bioquímica.** Universidad Complutense. Expediente 2.3

**1997-2002 Licenciatura de Biología.** Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Expediente 2.4

#### PREMIOS Y BECAS

**2010** Beca de asistencia al XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI)

**2009** Beca de asistencia al 2<sup>nd</sup> Congreso Europeo de Inmunología (ECI) – European Federation of Immunological Societies (EFIS)

**2008** Beca de asistencia al XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI)

**2004-2008** Beca de investigación pre-doctoral. "Comunidad Autónoma de Madrid (CAM)"  
BOCM 15/10/2004

**2002-2003** Beca del tercer ciclo - Universidad de Granada (UGR).

**2001-2003** Becas en cursos de investigación. Centro Mediterráneo - Universidad de Granada (UGR).

**1999-2002** Becas universitarias. "Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)", España.

#### SOCIEDADES PROFESIONALES

**2004-continúa** - Miembro de la Sociedad Española de Inmunología (SEI).

**2010-continúa** – Instituto de investigación Hospital 12 de Octubre (i+12).

#### EXPERIENCIA PROFESIONAL EN INVESTIGACIÓN

**2010- actual Investigador en la empresa biotecnológica Cytognos (Salamanca)**

**2005-2011 Defensa Tesis Doctoral.** Universidad Complutense de Madrid. Tesis: Estructura y función del complejo TCR/CD3 en las deficiencias congénitas y adquiridas (*Knock-Down*) de CD3.

**2006 Colaboración en investigación con la empresa Bristol Myers Squibb (Princeton, NJ)**  
Pharmaceutical Research Institute: *Clinical protocol IM103029*. "Dpto. Inmunología, Facultad de Medicina -Universidad Complutense de Madrid, España"

**2004-2009 Colaboración en docencia y prácticas de Biología y Medicina (160 horas).** Dpto. Inmunología. Facultad de Medicina -Universidad Complutense de Madrid. España.

**2002-2004 Colaboración en investigación** "Dpto. Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada" Tema: Caracterización y papel de los macrófagos durante el desarrollo.

**2001 Colaboración en investigación** "Estación experimental del Zaidín – CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Granada. Tema: Caracterización de los genes implicados en el metabolismo anaerobio del nitrato.

---

## CONGRESOS

2011 9<sup>th</sup> Joint Meeting of ICS-ISICR Cytokines and Interferons: From the bench to the bedside. 9-12 Octubre - Florencia (Italia).

- Differential requirement of N-ras for IFN- $\gamma$  expression in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector T cells. **Cytokine Volume 56, Issue 1, October 2011, Pages 18-18. doi:10.1016/j.cyto.2011.07.067.**

18<sup>th</sup> EuroFlow meeting – Lovaina (Bélgica) – 16-18 Marzo 2011 – Público asistente.

2010 XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) en San Sebastián, del 23 al 26 de Junio de 2010

- El polimorfismo c.657C>T en el exón 3 del gen CIAS1 no se encuentra asociado a NOMID (Neonatal-Onset Multisystem inflammatory disease). **Inmunología Vol. 29 No.1 pp94 (2010)**
- Papel diferencial de las cadenas CD3 $\gamma$  y CD3 $\delta$  en la expresión y función del complejo TCR/CD3 en células T maduras. **Inmunología Vol. 29 No.1 pp77 (2010)**
- El dominio Ig de CD3 $\delta$  es necesario para el desarrollo de los linfocitos T $\alpha\beta$  pero no  $\gamma\delta$  en humanos. **Inmunología Vol. 29 No.1 pp78 (2010)**

2<sup>a</sup> Reunión científica de la Red de Inflamación y Enfermedades Reumáticas (RIER)- Madrid.

- El polimorfismo c.657C>T en el exón 3 del gen CIAS1 no se encuentra asociado a NOMID (Neonatal-Onset Multisystem inflammatory disease). **RIER pp27 (2010)**
- El polimorfismo c.319G>T encontrado en CD3 $\gamma$  no se encuentra asociado a lupus eritematoso sistémico. **RIER pp27 (2010)**

15<sup>th</sup> EuroFlow meeting – Ámsterdam (Holanda)- 13-15 Octubre 2010 – Público asistente.

2009 1st Meeting of the Latin American Society for Primary Immunodeficiencies, Cartagena de Indias (Colombia).

- A novel human CD3D gene mutation associated with low numbers of T-cells.
- P.V131F Mutation in CD3G as a risk factor for immunodeficiency

2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology (ECI) – Septiembre 13-16, Berlín (Alemania).

- Learning the role of CD3gamma chain from the CD3 $\gamma$  immunodeficiencies (**PB11/109 ECI 2009**)
- A novel human CD3D gene mutation associated with low numbers of T-cells (**PC04-2 ECI 2009**).
- P.V131F Mutation in CD3G as a risk factor for immunodeficiency (**PC04/13 ECI 2009**)
- Role of CD3 $\gamma$  and CD3 $\delta$  in TCR/CD3 complex expression and function in mature T cells (**PB10/3 ECI 2009**).

I Congreso de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM) en Madrid, Mayo de 2009.

- Nuevos avances en el campo de la Inmunología Básica y Clínica y de las Terapias Biológicas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón – Público asistente.

2008 XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) en Mallorca, del 21 al 24 de Mayo de 2008.

- Papel de la cadena CD3 $\gamma$  del complejo TCR en la selección tímica: ¿Un caso cerrado? **Inmunología Vol. 27 No.1 pp113 (2008)**
- Contribución de CD3 $\gamma$  a la señalización vía TCR/CD3. **Inmunología Vol. 27 No.1 pp110 (2008)**
- Efecto diferencial de la falta pre-tímica y post-tímica de CD3 $\gamma$ . **Inmunología Vol. 27 No.1 pp113 (2008)**
- Mutación p.V131F en la región transmembranal de CD3G: ¿Factor de riesgo o polimorfismo?. **Inmunología Vol. 27 No.1 pp33 (2008)**

2007 XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) en Granada, del 28 al 31 de Marzo de 2007.

- Contribución de la cadena CD3 $\gamma$  a la señalización vía TCR/CD3. **Inmunología Vol.26 pp58 (2007).**
- Conformational differences in the surface  $\alpha\beta$ TCR/CD3 complex between CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are conserved in mammals and associated with differential glycosylation. **Inmunología. Vol. 26 pp126 (2007).**

2006 European Federation of Immunological Societies (EFIS) - 1st join meeting of European Nacional Societies of Immunology –Septiembre 2006 París.

- Comparative biological role of CD3 chains in human immunodeficiencies (**PC-1528 ECI 2006**).
- Lessons from human CD3 gamma deficiency: The human gamma delta T cell receptor must contain CD3 delta (**PC 1524- ECI 2006**).
- A role for glycosylation in the conformational differences between the surface TCR of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (**PC-2260 ECI 2006**).

Fundación Española de Ciencia y Tecnología (FECYT) Noviembre 2006. Facultad de Medicina UCM: “Ochoa, 100 años : mirando al futuro.”

- Estudio de la función de la cadena CD3 $\gamma$  en la señalización a través del complejo TCR/CD3.



2005 XXXII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) en Córdoba, del 10 al 13 de Mayo de 2005.

- Caracterización de linfocitos T deficientes de CD3 $\gamma$  transformados con HTLV-I. **Inmunología Vol. 24 No.1 pp125 (2005)**
- Estudio de la función de la cadena CD3 $\gamma$  en la señalización a través del complejo TCR/CD3. **Inmunología Vol. 24 No.1 pp130 (2005)**

## **PUBLICACIONES**

---

### **Publicaciones relacionadas con la tesis:**

- El complejo TCR/CD3: Especificidad con flexibilidad. Pérez-Flores V, Guardo AC, Rossi NE, Recio MJ, **Reiné J**, Regueiro JR. **Inmunología. 2006 Enero-Marzo ;1(25):50-56**
- CD3D. Recio MJ, **Reiné J**, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **Targeted Proteins Database 1, [21703] Current Biodata. 10.2970/tpdb.2008.172**
- CD3 $\gamma$ -independent pathways in TCR –mediated signaling in mature T and iNKT lymphocytes. **Reiné J**, Busto EM, Muñoz-Ruiz M, Rossi NE, Rodríguez-Fernández JL, Martínez-Naves E, JR Regueiro, Recio MJ. **Cellular Immunology 2011; 271(1):62-6 Epub 2011 Jun22.**
- A leaky mutation in CD3D leads to a T $\alpha\beta$  T $\gamma\delta^+$ B $^+$ NK $^+$  human SCID. Gil J, Busto EM, Cehan C, Garcillán B, Cruz García-Rodríguez M, Díaz-Alderete A, Navarro J, **Reiné J**, Mencía A, Gurbindo D, Beléndez C, Gordillo I, Duchniewicz M, Höhne K, López-Granados E, Schammel WW, Moreno-Pelayo MA, Recio MJ, Regueiro JR. **J Clin Invest 2011 Oct 3; 121(10):3872-6.**
- Human  $\alpha\beta$ TCR surface expression and function/signaling is differentially affected by partial silencing of CD3 $\gamma$  and CD3 $\delta$ . **Reiné J**, Recio MJ, Garcillán B, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **En preparación 2011**
- Inmunodeficiencias primarias asociadas al complejo TCR/CD3. **Reiné J**; Recio MJ, Regueiro JR. **En preparación 2011.**

### **Otras publicaciones:**

- Differential antibody binding to the surface  $\alpha\beta$ TCR-CD3 complex of CD4 $^+$  and CD8 $^+$  T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. Rossi NE, **Reiné J**, Pineda-Lezamis M, Pulgar M, Meza NW, Swamy M, Risueño R, Schamel WW, Bonay P, Fernández-Malavé E, Regueiro JR. **Int Immunol. 2008 Oct; 20(10):1247-58.**
- CD3G transmembrane mutation p.V131F as a putative immunodeficiency risk factor. Busto EM, **Reiné J**, Pérez-Flores V, Crespo AC, Medina A, Allende LM, Moreno-Pelayo MA, van Montfrans JM, Lefranc G, Regueiro JR, Recio MJ. **En preparación 2011.**
- c.657CT polymorphism in exon 3 of CIAS1 gene is not associated with Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease (NOMID). **Reiné J**, Couso J, Torrelo A, López-Robledillo JC, Gurbindo D, Regueiro JR, Recio MJ. **En preparación 2011.**

## **PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN**

---

- Título: “Caracterización de los genes implicados en el metabolismo anaerobio del nitrato.” Entidad financiadora: dgesic pb97-1216. Duración: 2001 IP: Eulogio J. Bedmar Gómez
  - Título: “Caracterización de la respuesta de macrófagos y microglía a lesiones experimentales durante el desarrollo inicial del sistema nervioso en aves.” Duración: 2002 – 2004 IP: Julio Navascués Martínez y Miguel Ángel Cuadros Ojeda.
  - Título: “Fisiopatología del complejo TCR/CD3” Entidad Financiadora: MEC (BFU2005-01738/BMC). Duración: 2005-2008 IP: Regueiro JR
  - Título: “Fisiopatología del complejo TCR/CD3 en ausencia de CD3 gamma: aproximación a la terapia génica de precursores hematopoyéticos para trasplante de médula ósea.” Entidad Financiadora: Fundación Mutua Madrileña. Duración: 2006-2009. IP: Regueiro JR
  - Título del proyecto: “Regulación de la diferenciación de los linfocitos T CD4 $^+$  por la señalización vía TCR/Ras” Entidad financiadora: UCM Duración: 2009 IP: Edgar G. Fernández Malavé
  - Título del proyecto: “Diferenciación y fisiopatología de las células Th17: implicación de las isoformas de Ras” Entidad financiadora: FIS Duración: 2009-2011 IP: Edgar G. Fernández Malavé
  - Título del proyecto: “Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre” Duración 2009-2011.
-

## **OTROS MÉRITOS**

---

### **Capacidad de gestión y administración:**

- Coordinador/Organizador del ciclo de conferencias del aula de Ciencias en el C.M. Albayzín (1998, Granada).
- Curso sobre Gestión de la Ciencia y la Tecnología (7ª Edición). Comunidad de Madrid-Fondo Social Europeo. IV PRICIT (Plan Regional de Ciencia y Tecnología de la Comunidad de Madrid).
- Curso de Gestión de Proyectos y de Certificados y metodologías (INTECO, Ministerio de Industria).
- Representante del sector de Estudiantes de postgrado en el Consejo de Departamento (Inmunología). 2009 (Madrid, Universidad Complutense).

### **Formación adicional (cursos seleccionados más relevantes):**

- DT Advanced de Microsoft (90 horas).
- Microscopía electrónica analítica. Universidad de Cádiz (UCA).
- Curso de Inglés del Kellington Institute – Granada.
- Nuevas Terapias basadas en el trasplante y manipulación genética de las células madre. Ciemat. Ministerio de Educación y Ciencia. Madrid.
- Asistencia a las Sesiones Interhospitalarias de Inmunodeficiencias Primarias en el Hospital Universitario La Paz (2005-2010)
- IX Reunión del registro de inmunodeficiencias primarias (REDIP). Hospital Universitario La Paz (2009).
- Curso de citometría FacsCanto II – Becton Dickinson – Cytognos – Salamanca (Septiembre 2010)
- 6<sup>th</sup> EuroFlow Educational Workshop – 26 Noviembre – Trinity Centre for Health Sciences, St. James Hospital - Dublín (Irlanda).